

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4854853号
(P4854853)

(45) 発行日 平成24年1月18日 (2012. 1. 18)

(24) 登録日 平成23年11月4日 (2011. 11. 4)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 211/21 (2006. 01)

C O 7 C 211/21 C S P

A 6 1 K 9/127 (2006. 01)

A 6 1 K 9/127

A 6 1 K 47/16 (2006. 01)

A 6 1 K 47/16

A 6 1 K 47/18 (2006. 01)

A 6 1 K 47/18

A 6 1 K 47/22 (2006. 01)

A 6 1 K 47/22

請求項の数 27 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-580975 (P2000-580975)
 (86) (22) 出願日 平成11年11月12日 (1999. 11. 12)
 (65) 公表番号 特表2002-529439 (P2002-529439A)
 (43) 公表日 平成14年9月10日 (2002. 9. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/026825
 (87) 国際公開番号 W02000/027795
 (87) 国際公開日 平成12年5月18日 (2000. 5. 18)
 審査請求日 平成18年11月10日 (2006. 11. 10)
 (31) 優先権主張番号 60/108, 117
 (32) 優先日 平成10年11月12日 (1998. 11. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 502221282
 ライフ テクノロジーズ コーポレーショ
 ン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 920
 08, カールスバッド, バン アレン
 ウェイ 5791
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

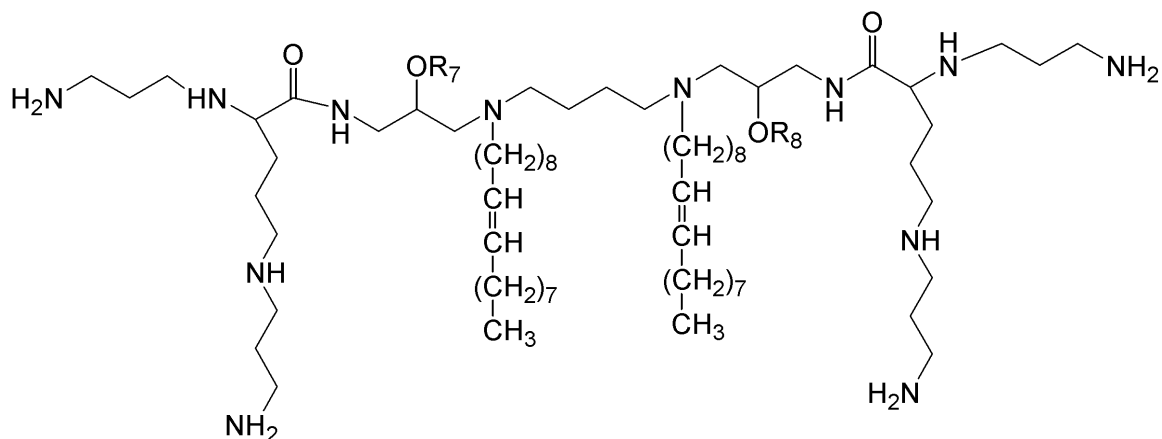
(54) 【発明の名称】 トランスフェクション薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下である化合物であって：

【化 8】



10

ここで、 R_7 および R_8 が、独立して、Hである、化合物。

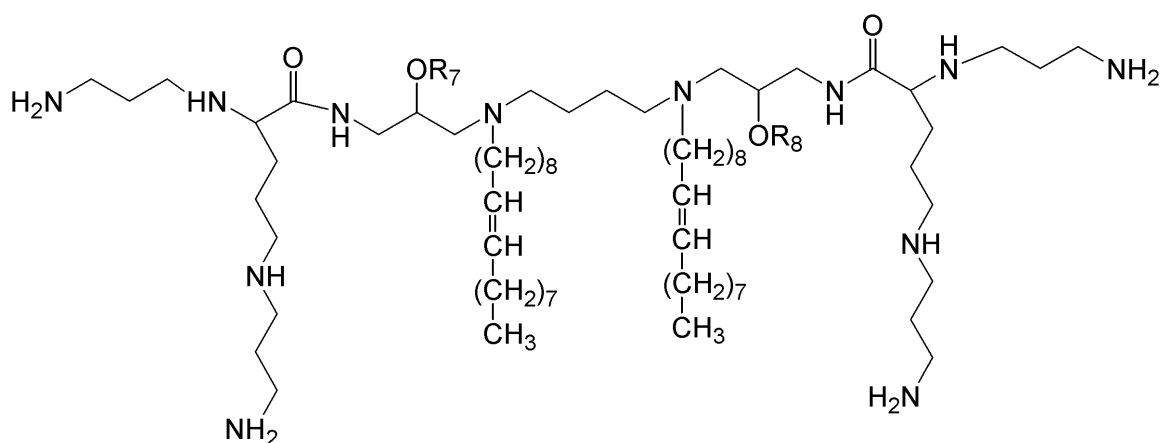
【請求項 2】

 R_7 および R_8 がHである、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

20

以下である化合物であって：
【化 9】



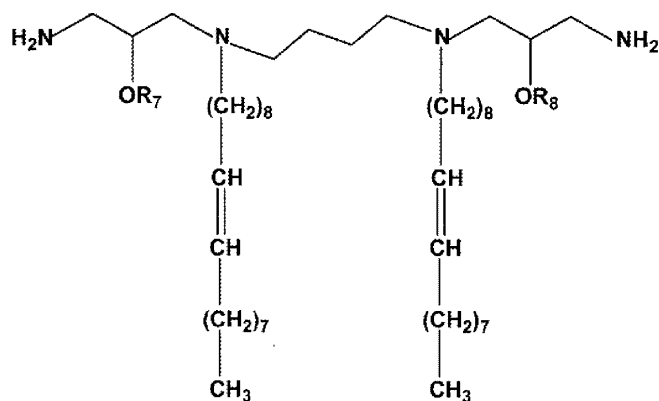
10

ここで、 R_7 および R_8 が、H である、化合物。

【請求項 4】

以下の式で表される化合物であって：

【化 1 2】



20

ここで、 R_7 および R_8 が、独立して、H である、化合物。

【請求項 5】

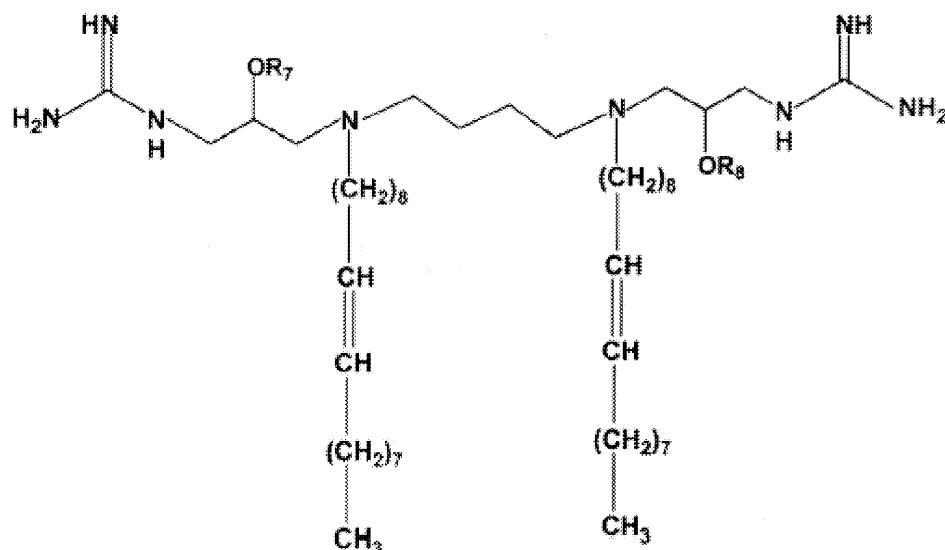
R_7 および R_8 が H である、請求項 4 に記載の化合物。

【請求項 6】

以下の式を有する化合物であって：

30

【化 1 4】



ここで、 R_7 および R_8 が、独立して、Hである、化合物。

【請求項 7】

R_7 および R_8 がHである、請求項6に記載の化合物。

【請求項 8】

1つまたは複数の細胞に、ポリアニオンを導入するための組成物であって、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物および少なくとも1つのさらなる成分を含む、組成物。

【請求項 9】

前記1つの少なくとも1つのさらなる成分が、細胞、複数の細胞、細胞培養物、細胞培養培地、中性脂質、核酸、およびトランスフェクションエンハンサーからなる群から選択される、請求項8に記載の組成物。

【請求項 10】

少なくとも1つのさらなる成分が、中性脂質である、請求項9に記載の組成物。

【請求項 11】

少なくとも1つのさらなる成分が、核酸である、請求項9に記載の組成物。

【請求項 12】

中性脂質をさらに含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項 13】

中性脂質がジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリンまたはコレステロールである、請求項10または12に記載の組成物。

【請求項 14】

請求項1～7のいずれか1項に記載の1以上の化合物を含む脂質凝集物。

【請求項 15】

少なくとも1つの中性脂質を含む、請求項14に記載の脂質凝集物。

【請求項 16】

前記脂質凝集物形成化合物が、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリンおよびコレステロールからなる群から選択される、請求項15に記載の脂質凝集物。

【請求項 17】

1つまたは複数の細胞をトランスフェクトするためのキットであって、

(a) 請求項1～7のいずれか1項に記載の1以上の化合物；

(b) 1つの細胞、複数の細胞、細胞培養培地、核酸、およびトランスフェクションエンハンサーからなる群から選択される、少なくとも1つのさらなる成分；および

(c) 1つまたは複数の細胞をトランスフェクトするための説明書、

を含む、キット。

【請求項 18】

インビトロで1つまたは複数の細胞に、ポリアニオンを導入するための方法であって、該方法が、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物から脂質凝集物を形成する工程、該脂質凝集物をポリアニオンと接触させて、正に荷電したポリアニオン-脂質凝集物複合体を形成する工程、および該複合体を1つまたは複数の細胞と共にインキュベートする工程、を含む方法。

【請求項 19】

前記ポリアニオンが核酸である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記脂質凝集物がリポソームである、請求項18または19に記載の方法。

【請求項 21】

インビトロで細胞に、生物学的に活性な物質を導入するための方法であって、該方法が、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物および生物学的に活性な物質のリポソームを形成する工程、ならびに該リポソームを細胞または細胞培養物と共にインキュベートする工程を含む、方法。

【請求項 22】

ポリアニオンをインビトロまたはエキスピボで細胞に導入するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物およびポリアニオンを含むポリアニオン-脂質凝集物複合体の使用。

【請求項 23】

ポリアニオンを細胞に導入するための組成物の製造における、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物およびポリアニオンを含むポリアニオン-脂質凝集物複合体の使用。

【請求項 24】

前記脂質凝集物がリポソームである、請求項22または23に記載の使用。

【請求項 25】

生物学的に活性な物質をインビトロまたはエキスピボで細胞に導入するための、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物および生物学的に活性な物質を含むリポソームの使用。

【請求項 26】

生物学的に活性な物質を細胞に導入するための組成物の製造における、請求項1～7のいずれか1項に記載の化合物および生物学的に活性な物質を含むリポソームの使用。

【請求項 27】

前記細胞が、インビトロの細胞である、請求項22～26のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、カチオン性脂質、ならびに高分子および他の物質の細胞内への送達のための脂質凝集体における利用を有するカチオン性脂質の組成物に関する。

【0002】

(関連技術)

リポソームのような脂質凝集体は、高分子（例えば、DNA、RNA、タンパク質）、および小さな化学物質（医薬品など）を細胞に導入するための、送達のための薬剤として有用であることが見出されている。特に、カチオン性脂質成分を含む脂質凝集体は、アニオン性分子の細胞への送達において、特に有効であることが示されている。部分的に、カチオン性脂質の有効性は、その多くが正味の負の電荷を有する細胞に対する増強された親和性から生じると考えられる。また、部分的に、カチオン性脂質を含む脂質凝集体上の正味の正の電荷により、凝集体がポリアニオン（例えば、核酸）に結合することが可能となる

10

20

30

40

50

。DNAを含む脂質凝集体は標的細胞の効率的なトランスフェクションのための有効な薬剤であることが知られている。

【0003】

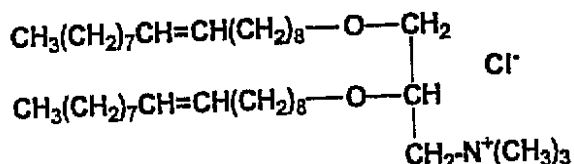
種々のタイプの脂質凝集体の構造は、組成および凝集体を形成する方法に依存して変化する。このような凝集体には、リポソーム、単ラメラ (unilamellar) ベシクル、多重ラメラベシクル、ミセルなどが挙げられ、ナノメートルからマイクロメートルの範囲の特定のサイズを有する。脂質凝集体を作製する方法は、これまでに当該分野において周知である。送達のための従来のリン脂質含有リポソームの使用に対する主な欠点は、送達される物質がカプセル化されなくてはならず、そしてこのリポソーム組成物は、負に荷電した細胞表面に引きつけられない、正味の負の電荷を有しているということである。カチオン性脂質化合物とリン脂質を合わせることによって、正に荷電したベシクルおよび他のタイプの脂質凝集体は、DNA (これは負に荷電している) に結合し得、標的細胞によって取り込まれ得、そして標的細胞をトランスフェクトし得る (Felgner, P. L. ら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417; Epstein, D. ら、米国特許第4, 897, 355号)。

【0004】

周知のカチオン性脂質は、塩化N-[1-(2, 3-ジオレオイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム (DOTMA) である。このDOTMAの構造は以下の通りである：

【0005】

【化66】



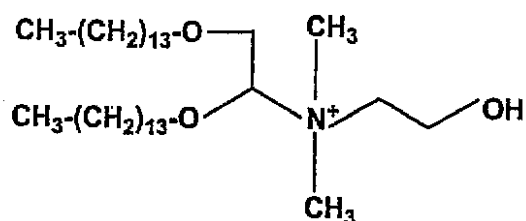
DOTMAそれ自体、またはジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) との1:1の組合せにおいて、DOTMAは、標準的な技術を使用してリポソームへ処方される。上記のFelgnerらは、このようなリポソームは、核酸のいくつかのタイプの細胞への効率的な送達を提供することを立証した。DOTMA:POPE (1:1) 処方物は、商品名LIPOFECTIN (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) で市販されている。別の市販されているカチオン性脂質は、1, 2-ビス (オレオイルオキシ) -3, 3-(トリメチルアンモニア) プロパン (DOTAP) であり、これは、オレオイル部分が、プロピルアミンへのエーテル結合ではなく、エステルを介して結合されていることのみがDOTMAとは異なる。関連した群の化合物は、トリメチルアンモニウム基のメチル基の1つがヒドロキシエチル基によって置換されている点で、DOTMAおよびDOTAPとは異なる。このタイプの化合物は、ホスホリパーゼAのローゼンターリンヒビター (RI) (Rosenthal, A. F. およびGeyer, R. P. (1960) J. Biol. Chem. 235: 2202-2206) と類似しており、このローゼンターリンヒビターは、プロピルアミンコアに結合したステアロイルエステルを有する。RIのジオレオイルアナログは、脂肪酸部位のプロピルアミンコアへの結合に依存して、DORIエーテルおよびDORIエステルと、一般に略記される。ヒドロキシ基が、さらなる官能基化のための部位として使用され得る。

【0006】

RIのジミリスチルオキシアナログは、DMRIEとして知られている。1:1 (M/M) DMRIE:コレステロール処方物は、商品名DMRIE-C (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) で市販されている。DMRIEの構造は、以下の通りである：

【0007】

【化67】

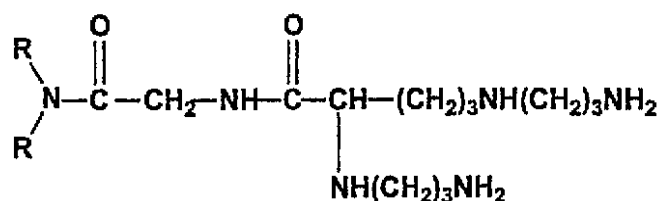


10

別のクラスの化合物が、Behrら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986 (1989); EPO公開 0 394 111 (1990年10月24日) (ここで、カルボキシスぺルミンが、2つのタイプの脂質と結合体化されている)) によって開示されている。5-カルボキシスぺルミルグリシンジオクタデシルアミド (DOGS) の構造は以下の通りである:

【0008】

【化68】



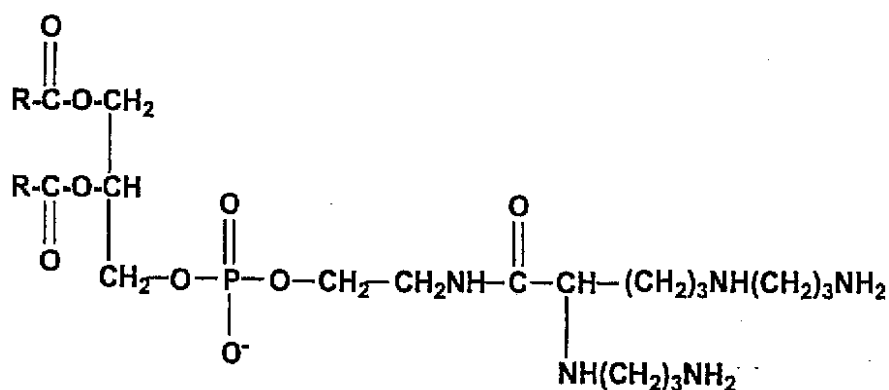
20



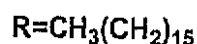
ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン5-カルボキシスぺルミルアミド (DPPEs) の構造は以下の通りである:

【0009】

【化69】



40



DOGSおよびDPPEsの両方は、プラスミドをコーティングし、効率的なトランスフェクションを提供する脂質凝集体複合体を形成するために、使用されてきた。これらの化合物は、いくつかの細胞株のトランスフェクションに対して、DOTMAより効率的で、そして、より毒性が低いことが主張される。DOGSは、TRANSFECTAM™ (Promega, Madison, Wis.) として市販されている。

【0010】

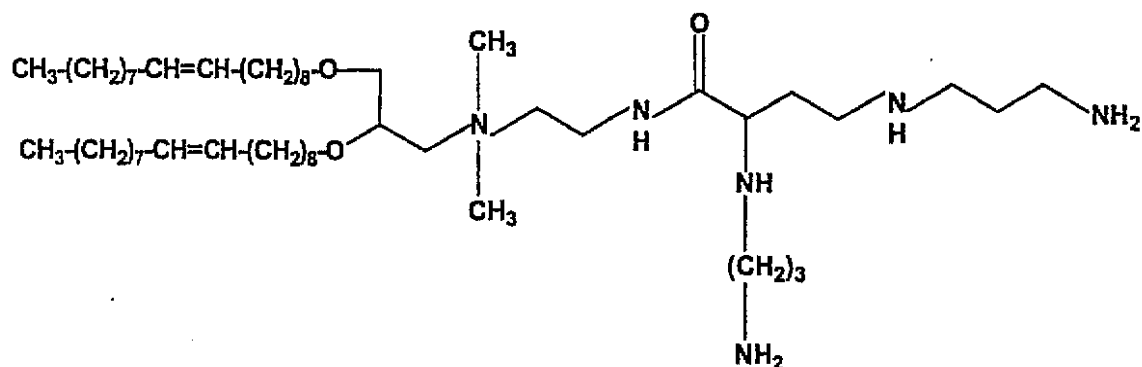
カルボキシスぺルミンがアミド結合を介して脂質に結合体化された別の種類の化合物がま

50

た、記載されている (Gebeyehu, G. ら、米国特許第 5, 334, 761 号)。これらの化合物は、核酸の種々の細胞への効率的な送達のために有用であり、また他のこのような脂質を作製するための中間体である。2, 3-ジ-オレイルオキシ-N-[2 (スベルミン-カルボキサミド) エチル]-N, N-ジメチル-1-プロパン-アミニウム (DOSPA) は、LipofectAMINE (Life Technologies, Inc., Rockville, MD から入手可能) の商品名で、DOPE との 3:1 (w/w) 処方物として入手可能である。DOSPA の構造は以下の通りである：

【 0 0 1 1 】

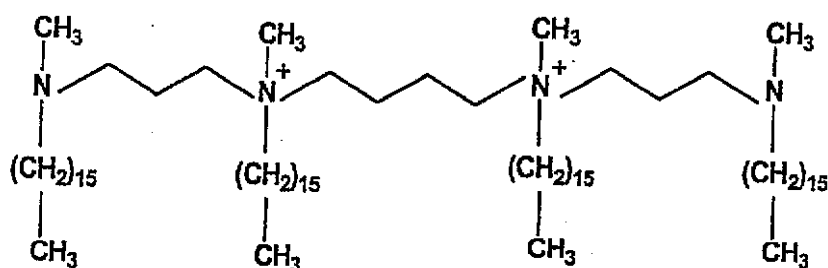
【化 7 0】



スベルミンヘッドグループを有する脂質化合物もまた、記載される（H a c e s , A . , ら、米国特許第5, 674, 908号）。これらの化合物は、核酸の昆虫細胞への送達のために特に有用である。テトラメチルテトラパルミチルスベルミン（TM-TPS）のD O P E に対する1:1.5（M/M）処方物は、商品名C e l l F E C T I N（L i f e T e c h n o l o g i e s , I n c . , R o c k v i l l e , M D）で市販されている。TM-TPSの構造は以下に示される：

【 0 0 1 2 】

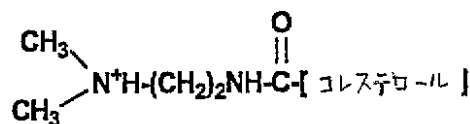
【化 7 1】



カチオン性コレステロール誘導体（DC-Chol）は合成され、DOP E との組合せでリポソームへ処方されてきた（Gao, X. および Huang, L. （1991）Biochim. Biophys. Res. Comm. 179：280～285）。この化合物の構造は以下の通りである：

【 0 0 1 3 】

【化 7 2】



DC-Cholを用いて処方されたりポソームは、DOTAM含有リポソームより効率的なトランスフェクションおよびより低い毒性を、いくつかの細胞株に提供すると言われる。

【0014】

リポポリリシン（これは、ポリリシンのDOPEへの結合体化によって形成される）は、血清の存在下（インビボで遭遇するような条件）でのトランスフェクションに対して特に有効であることが報告されている（Zhou、X. ら（1991）*Biochim. Biophys. Acta* 1065: 8-14）。

【0015】

その分野での進歩にもかかわらず、種々の改善されたカチオン性脂質化合物に対する必要性が残っている。特に、全ての細胞型に十分に作用する、単一のカチオン性脂質は現在まで見出されていない。異なる細胞型は、膜組成が互いに異なるために、脂質凝集体の異なる組成およびタイプは、異なる細胞型に対して、標的細胞膜と接触および融合するそれらの能力または移動プロセス自体の局面のいずれかに起因して有効であることは驚くべきことではない。現在のところ、これらのプロセスは、十分には理解されておらず、従って、有効なリポソーム前駆体の設計は、大部分が経験的である。含量および移動の他に、他のファクター（例えば、意図した目的に適切な脂質凝集体を形成する能力、血清の存在下で細胞をトランスフェクトする可能性、標的細胞への毒性、送達される化合物に対するキャリアとしての安定性、およびインビボ環境において機能する能力）が重要である。さらに、脂質凝集体は、細胞に送達され得る物質の範囲を広くすることによって改善され得る。本発明のカチオン性脂質化合物は、いくつかの先の特性に関して改善された機能を有する。

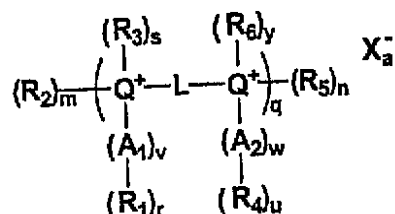
【0016】

（発明の要旨）

本発明は、一般式（A）：

【0017】

【化73】



に従う新規なカチオン性脂質を提供し、ここで、

QはN、OおよびSからなる群から選択され；

Lは各Qと共有結合し得る任意の2個の有機基であり、これらの例は、C、CH、 $(\text{CH}_2)_1$ または $\{(\text{CH}_2)_i - \text{Y} - (\text{CH}_2)_j\}_k$ であり、ここで、Yは CH_2 、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カーボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニル、および第二級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、Yは必要に応じて $-\text{X}_1 - \text{L}' - \text{X}_2 - \text{Z}$ または $-\text{Z}$ によって置換され；

$\text{R}_1 \sim \text{R}_6$ は、互いに独立して、H、 $-(\text{CH}_2)_p - \text{D} - \text{Z}$ 、アルキル、アルケニル、アリール、およびアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル

10

20

30

40

50

、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基の1つ以上によって、必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そしてここで、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 の少なくとも1つは、直鎖もしくは分枝鎖、環状の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり；そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 の任意の少なくとも1つは、必要に応じて、互いに、YまたはL（LがCまたはCHである場合）と共有結合し、環状部位を形成し；

Zは、アミン、スペルミイル（spermil）、カルボキシスペルミイル（carboxyspermil）、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

X_1 および X_2 は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L'は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

DはQまたは結合であり；

A_1 および A_2 は、互いに独立して、 CH_2O 、 CH_2S 、 CH_2NH 、 $C(O)$ 、 $C(NH)$ 、 $C(S)$ 、および $(CH_2)_t$ からなる群から選択され；

Xは生理学的に受容可能なアニオンであり；

m、n、r、s、u、v、wおよびyは0または1であり、但し、mおよびnの両方が0の場合、r、s、uおよびyの少なくとも1つは0以外であり；

i、j、k、l、pおよびtは0～約100であり；

qは1～1000の整数であり；そして

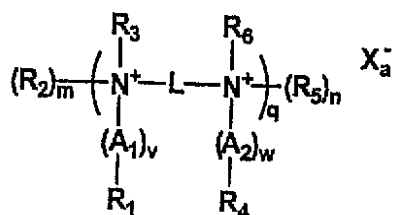
aはアニオンの価数によって除算された正電荷の数である。

【0018】

さらに、本発明は、以下の一般式（B）：

【0019】

【化74】



に従う新規なカチオン性脂質を提供し、ここで、

Lは、 $(CH_2)_1$ または $\{(CH_2)_i - Y - (CH_2)_j\}_k$ であり、ここで、Yはエーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カーボネート、および第二級アミノ基からなる群から選択され；

$R_1 \sim R_6$ は、互いに独立して、H、 $-(CH_2)_p - Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、ならびに必要に応じて1つ以上のアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり、好ましくは、約2～100個、好ましくは4～75個、より好ましくは6～64個、より好ましくは8～50個、より好ましくは8～40個、より好ましくは8～30個、より好ましくは6～30個、より好ましくは4～30個、より好ましくは2～30個、最も好ましくは

8～約24個の炭素原子を有し、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの任意の1つ以上が、必要に応じて、互いに共有結合され、環状部位を形成し得；

Zは、アミン、スペルミール、カルボキシスペルミール、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

A_1 および A_2 は、互いに独立して、 CH_2O 、 CH_2S 、 CH_2NH 、 $C(O)$ 、 $C(NH)$ 、 $C(S)$ 、および $(CH_2)_t$ からなる群から選択され；

Xは生理学的に受容可能なアニオン（例えば、ハロゲン化物アニオン、塩化物、臭化物およびヨウ化物、ならびにアセテート、スルフェート、トリフルオロアセテートなど）であり；

10

m、n、vおよびwは0または1であり；

i、j、k、l、pおよびtは、1～約100、より好ましくは1～50、より好ましくは1～25、より好ましくは1～15、より好ましくは1～10であり、最も好ましくは1～約4の整数であり；

qは、1～約1000、好ましくは1～約500、より好ましくは1～約250、より好ましくは1～約100、より好ましくは1～約50、より好ましくは1～約25、より好ましくは1～約12、最も好ましくは1～約6の整数であり；そして

aは、アニオンの価数によって除算された正電荷の数であり、ここで、mおよびnが0である場合、aは0である。

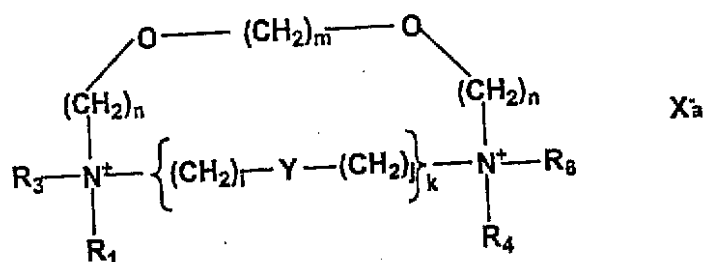
20

【0020】

また、本発明は、以下の式(C)

【0021】

【化75】



30

に従う新規のカチオン性脂質を提供し、ここで、

Yは CH_2 、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニル、および第二級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、Yは必要に応じて $-X_1-L'-X_2-Z$ または $-Z$ によって置換され；

R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 は、互いに独立して、 H 、 $-(CH_2)_p-D-Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基の1つ以上によって、必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 の少なくとも1つは、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり、最も好ましくは約8～約24個の炭素原子を有し、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 は、必要に応じて、互いに、またはYと共有結合し、環状部位を形成し得；

40

Zは、アミン、スペルミール、カルボキシスペルミール、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

50

X_1 および X_2 は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L' は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

DはQまたは結合であり；

mおよびnは0または1であり；そして

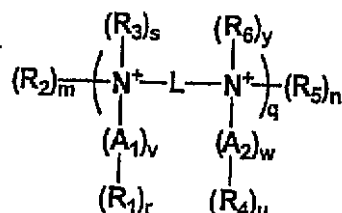
i、j、k、lおよびpは0～約10の整数である。

【0022】

さらに、本発明は、以下の式(D)：

【0023】

【化76】



に従う化合物またはポリカチオンを提供し、ここで、

L は、C、CH、 $(CH_2)_1$ または $\{(CH_2)_i - Y - (CH_2)_j\}_k$ であり、ここで、 Y は CH_2 、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カーボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニルおよび第二級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、 Y は必要に応じて $-X_1 - L' - X_2 - Z$ または $-Z$ によって置換され；

$R_1 \sim R_6$ は、互いに独立して、H、 $-(CH_2)_p - D - Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、ならびに必要に応じて1つ以上のアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そしてここで、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり、好ましくは約2～約30個の炭素原子、より好ましくは8～24個の炭素原子を有し；

Z は、アミン、スペルミイル、カルボキシスペルミイル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

X_1 および X_2 は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L' は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

A_1 および A_2 は、互いに独立して、 CH_2O 、 CH_2S 、 CH_2NH 、 $C(O)$ 、 $C(NH)$ 、 $C(S)$ 、および $(CH_2)_t$ からなる群から選択され；

m、n、r、s、u、v、wおよびyは0または1であり、但し、mおよびnの両方が0の場合、r、s、uおよびyの少なくとも1つは0以外であり；

i、j、k、l、pおよびtは、0～約100の整数であり；そして

qは1～約1000の整数である。

【0024】

本発明はまた、以下の式(I)に従う化合物またはポリカチオンを提供する：

【0025】

10

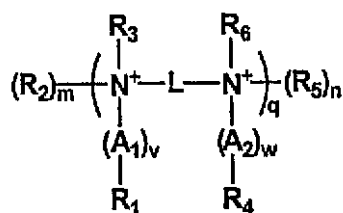
20

30

40

50

【化 7 7】



10

ここで、

Lは、 $(\text{CH}_2)_1$ または $\{(\text{CH}_2)_i - \text{Y} - (\text{CH}_2)_j\}_k$ であり、ここで、Yは、 CH_2 、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、および2級アミノ基からなる群から選択され；

$\text{R}_1 \sim \text{R}_6$ は、互いに独立して、 H 、 $-(\text{CH}_2)_p - \text{Z}$ 、アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルケニルまたはアリール基であり、好ましくは、約2～約30個の炭素原子を有し、より好ましくは、約8個～約24個の炭素原子を有し；

20

Zは、アミン、スペルミイル、カルボキシスペルミイル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

A_1 および A_2 は、互いに独立して、 CH_2O 、 CH_2S 、 CH_2NH 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{NH})$ 、 $\text{C}(\text{S})$ および $(\text{CH}_2)_t$ からなる群から選択され；

m 、 n 、 v および w は、0または1であり；

i 、 j 、 k 、 l 、 p および t は、1～約100の整数であり；そして

30

q は、1～約1000の整数である。

【0026】

本発明はまた、上記の式の範囲内に入る新規な化合物を提供する。

【0027】

本発明の化合物は、単独で、またはリポソームもしくは他の脂質凝集体内への処方のための他の脂質凝集体形成成分（例えば、DOPE、DOPCまたはコレステロール）と組み合わせにおいてのいずれかで、有用である。このような凝集体は、ポリカチオン性であり、核酸のようなアニオン性高分子と安定な複合体を形成し得る。この脂質凝集体高分子複合体は、細胞による吸収および摂取に対してポリアニオン性高分子を有用にする細胞と相互作用する。

40

【0028】

本発明は、本発明の1つ以上の化合物を含む脂質凝集体を提供する。好ましくは、この脂質凝集体は、少なくとも1つの脂質凝集体形成化合物を含む。好ましくは、この脂質凝集体形成化合物は、DOPE、DOPCおよびコレステロールからなる群から選択される。

【0029】

本発明の化合物はまた、タンパク質、ペプチド、成長因子などのような種々の有用な分子および物質に結合され得るか、または混合され得るか、または組み合わせて使用され得、細胞ターゲティング、摂取、内在化、核ターゲティングおよび発現を向上させる。

【0030】

本発明はまた、本発明の1つ以上の化合物またはそれらの混合物を含む脂質凝集体を含む

50

。このような脂質凝集体は、1以上の凝集体形成成分および／またはトランスフェクションエンハンサーと組み合わせられ得る。

【0031】

本発明の化合物もしくは組成物（例えば、上記のもの）またはそれらの混合物を採用する本発明のトランスフェクション方法は、細胞のインビトロトランスフェクションおよびインビボトランスフェクション、特に、動物細胞、ヒト細胞、昆虫細胞、植物細胞、鳥類細胞、魚類細胞、哺乳動物細胞などを含む真核生物細胞または組織のトランスフェクションに適用され得る。

【0032】

従って、本発明は、細胞（単数または複数）内へポリアニオンを導入するための方法を提供し、ここでこの方法は、本発明に従う正に荷電した化合物からリボソームを形成すること、リボソームをポリアニオンと接触させて正に荷電したポリアニオン-リボソーム複合体を形成すること、およびこの複合体を細胞（単数または複数）でインキュベートすることを包含する。

10

【0033】

本発明の方法は、有用な遺伝子産物を発現するトランスフェクトされた細胞または組織を発生させるために使用され得る。本発明の方法はまた、トランスジェニック動物の産生における1工程として使用され得る。本発明の方法は、細胞または組織への核酸の導入を必要とする任意の治療学的方法において有用である。特に、これらの方法は、ガン治療、インビボおよびエクスピボ遺伝子治療、ならびに診断学的方法において有用である。例えば、F e l g n e rらの米国特許第5, 589, 466号、および1995年5月25日に出願されたJ e s s e eらの米国特許出願第08/450, 555号を参照のこと。本発明のトランスフェクション化合物または組成物は、研究目的のために行われた細胞または組織の任意のトランスフェクションにおける研究薬剤として使用され得る。本発明の方法によってトランスフェクトされ得る核酸は、天然の塩基または非天然の塩基を含む任意の供給源由来のDNAおよびRNAを含み、そして細胞または組織内の治療学的または別に有用であるタンパク質をコードし発現し得るもの、細胞または組織内の核酸の発現を阻害するもの、反応を触媒するもの（リボザイム）、および診断学的アッセイにおいて機能するものを含む。

20

【0034】

本明細書中に与えられる化合物、組成物および方法はまた、特に、ポリアミン、ポリアミン酸、ポリペプチド、タンパク質、ビオチン、およびポリサッカリドを含む核酸を除く生物学的に活性な高分子または物質を細胞内に導入するために、本明細書中の開示の点で容易に適用され得る。例えば、治療学的薬剤、診断学的物質および研究薬剤の他の有用な物質は、本発明の方法によって細胞内に導入され得る。好ましい局面において、任意の核酸ベクターは本発明によって細胞にまたは細胞内に送達され得る。

30

【0035】

従って、本発明は、生物学的に活性な物質を細胞内に導入するための方法を提供し、ここでこの方法は、本発明に従う化合物および生物学的に活性な物質のリボソームを形成すること、ならびに細胞または細胞培地でリボソームをインキュベートすることを包含する。

40

【0036】

本発明はまた、本発明の化合物ならびに核酸、細胞、緩衝液、培養培地、生物学的に活性な物質、中性脂質およびトランスフェクションエンハンサー、好ましくは核酸からなる群から選択される1つ以上の追加の成分を含む組成物に関する。

【0037】

本発明はまた、本発明の1つ以上の化合物もしくは組成物またはそれらの混合物を含むトランスフェクションキットを含む。特に、本発明は、本発明の1つ以上の化合物および、細胞（単数および複数）、細胞培養培地、核酸、トランスフェクションエンハンサーからなる群から選択される少なくとも1つの追加の成分ならびに細胞（単数または複数）をトランスフェクトするための説明書を含むキットを提供する。

50

【0038】

本発明はまた、中間体ならびに本発明の化合物または組成物を生成するためのこのような中間体を使用するための方法に関する。本発明はまた、本発明の合成方法において使用される物質（中間体、化合物、脂質など）の相互作用によって得られる組成物、化合物または成分に関する。

【0039】

本発明の他の好ましい実施形態は、本発明の以下の図面および記載の点で、当業者にとって明らかである。

【0040】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

本発明は、細胞内への高分子および他の化合物の送達のための脂質凝集体における有用性を有するカチオン性脂質およびカチオン性脂質の組成物に関する。この化合物は、単独で、あるいはインビトロまたはインビボのいずれかで標的細胞への化合物のトランスフェクションまたは送達に対して適切であるリポソームおよび他の脂質凝集体を調製するために他の化合物と組み合わせて使用され得る。

【0041】

本発明の化合物は、好ましくはポリカチオン性であり、好ましくは従って種々のアニオン性高分子、特に核酸のようなポリアニオンと高度に安定な複合体を形成する。これらの化合物は、水中に分散される際に、それらのカチオン性部分を介してポリアニオンと強く会合する脂質凝集体を形成するという特性を有する。アニオン性化合物に対して過剰のカチオン性電荷を使用することによって、ポリアニオン-脂質複合体が細胞膜上に吸着され得、それによって細胞による所望の化合物の摂取を容易にする。

【0042】

本発明はまた、本発明の化合物および組成物を調製するための中間体に関する。

【0043】

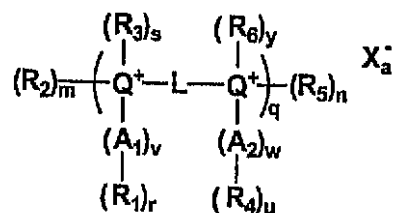
より具体的には、本発明は、高スループット適用に対して有用にする発現研究（CHO-K1、COS-7、およびHEK293）において使用される3つの最も通常の細胞タイプの市販される製品より大きなトランスフェクション効率を有し；そして追加の薬剤（例えば、Life Technologies, Inc., Rockville, MDから利用可能なLipofectAMINE PLUS Reagent）が必要とされないという事実によって規定されるプロトコルを使用するための単純さを有し、血清の除去、従って培地の交換が必要とされず、そしてDNA/脂質複合体がアッセイ前に細胞から除去される必要がない、トランスフェクションのためのカチオン性脂質に関する。

【0044】

本発明に従う化合物は、以下の式（A）を有する：

【0045】

【化78】



ここで、

Qは、N、OおよびSからなる群から選択され；

Lは、C、CH、(CH₂)₁、または{(CH₂)_i-Y-(CH₂)_j}_kのような各Qを共有結合し得る任意の二価の有機基であり、ここで、Yは、CH₂、エーテル、ポリエー

10

20

30

40

50

テル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニル、および2級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、Yは、 $-X_1-L'-X_2-Z$ または $-Z$ によって必要に応じて置換されており；

$R_1 \sim R_6$ は、互いに独立して、 H 、 $-(CH_2)_p-D-Z$ 、アルキル、アルケニル、アリーール、ならびにアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そしてここで、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリーール基であり；そして R_1 と R_4 が、または R_3 と R_6 が、Yによって、またはL（LがCまたはCHであり、環式部分を形成する場合）によって、必要に応じて互いに共有結合され得；

Zは、アミン、スペルミイル、カルボキシスペルミイル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

X_1 および X_2 は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L'は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

Dは、Qまたは結合であり；

A_1 および A_2 は、互いに独立して、 CH_2O 、 CH_2S 、 CH_2NH 、 $C(O)$ 、 $C(NH)$ 、 $C(S)$ および $(CH_2)_t$ からなる群から選択され；

Xは、生理学的に受容可能なアニオンであり；

m、n、r、s、u、v、wおよびyは、0または1であり、但し、mおよびnの両方が0である場合、r、s、uおよびyのうちの少なくとも1つが、0ではなく；

i、j、k、l、pおよびtは、0～約100の整数であり；

qは、1～約1000の整数であり；そして

aは、アニオンの価数によって除算された正電荷の数である。

【0046】

好ましくは、必要に応じて1つ以上のアルコール基によって置換されるアルキルエーテルは、炭水化物を含む。好ましくは、炭水化物は、ガラクトース、フルクトース、グルコース、マルトース、スクロース、セロビオース、ラクトース、マンノース、グルコピラノース、マンノピラノースおよびガラクトピラノースからなる群から選択される。

【0047】

好ましくは、i、j、k、lおよびtは、1～100、より好ましくは1～50、より好ましくは1～25、より好ましくは1～15、より好ましくは1～10および最も好ましくは1～約4から独立して選択される整数である。好ましくは、l、bおよびcは、1～約4の整数であり、iおよびjは約2～約3の整数であり、そしてkは1～約3の整数である。

【0048】

好ましくは、qは1～約500、より好ましくは1～約250、より好ましくは1～約100、より好ましくは1～約50、より好ましくは1～約25、より好ましくは1～約12、最も好ましくは1～約6の整数である。

【0049】

好ましくは、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 の少なくとも1つは、約2～100個、好ましくは4～75個、より好ましくは6～64個、より好ましくは8～50個、より好ましくは8～40個、より好ましくは8～30個、より好ましくは6～30個、より好ましくは4～30個、および最も好ましくは8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリーール基である。

【0050】

本発明の全ての局面において、同じかまたは異なり得、好ましくは同じである最も適切な R_1 および R_4 基は、脂肪酸または脂肪アシルクロリドのようなそれらの活性化された誘導体から誘導される C_{6-30} 炭化水素基 (hydra carbon radical) である。従って、代表的な R_1 および R_4 基は、 C_{6-30} アルキルまたはアルケニル基である。

【0051】

好ましくは、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 および R_6 は、互いに独立して、H、 C_1-C_8 アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルからなる群から選択され、そして、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基である。

10

【0052】

好ましくは、QはNである。

【0053】

好ましくは、Yは CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択される。

【0054】

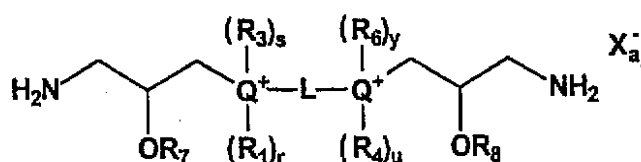
上記の式(A)の範囲内にある有用な化合物は、以下の式(A1)～(A10)を有する化合物を含む：

20

【0055】

【化79】

(A1)



30

ここで、

QおよびLが、上記に定義される通りであり；

R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 が、互いに独立して、Hおよび C_1-C_8 アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；
 r 、 s 、 u および y が、0または1であり；そして

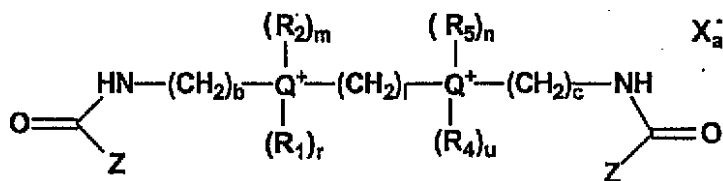
R_7 および R_8 は、独立して、Hまたは炭水化物である；

40

【0056】

【化80】

(A2)



10

ここで、

Qが、上記に定義される通りであり；

R₁、R₂、R₄およびR₅が、互いに独立して、HおよびC₁–C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；Zは、スperlミイル (spermilyl)、スperlミジイル (spermidiyl)、アミノ酸、ペプチジル、ジアミノアルキル、およびポリアミンからなる群から選択され；m、n、rおよびuは、0または1であり；そして

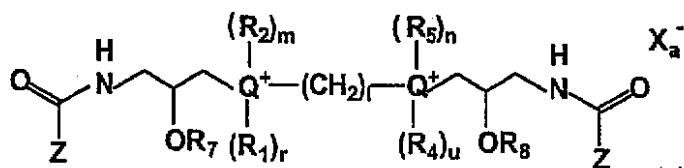
l、bおよびcが、1～約4から独立して選択される整数である；

20

【0057】

【化81】

(A3)



30

ここで、

Q、R₁、R₄、m、n、rおよびuが、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅が、互いに独立して、HおよびC₁–C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

Zが、スperlミイル、スperlミジイル、アミノ酸、ペプチジル、ジアミノアルキル、およびポリアミンからなる群から選択され；

40

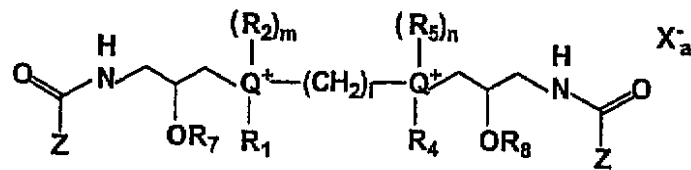
R₇およびR₈が、独立して、Hまたは炭化水素であり；そして

lが1～約4の整数である；

【0058】

【化82】

(A4)



10

ここで、

Qは、上記に定義される通りであり、好ましくは、Nであり；

R₁およびR₄のうちの少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、HおよびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

Zは、スベルミール、スベルミジール、アミノ酸、ペプチジル、ジアミノアルキル、およびポリアミンからなる群から選択され；

20

R₇およびR₈が、独立して、Hまたは炭化水素であり、好ましくはHであり；

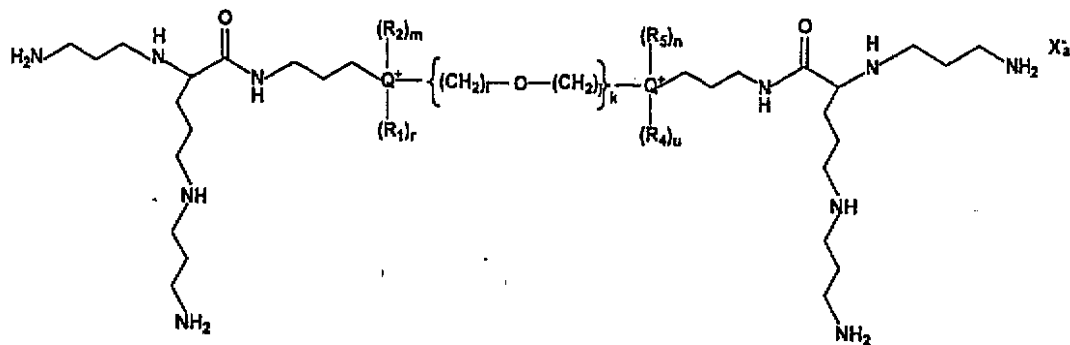
mおよびnは上記に定義される通りであり；そして

lが1～約4の整数である；

【0059】

【化83】

(A5)



30

ここで、

Q、R₁、R₄、r、u、mおよびnは、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、H、およびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

iおよびjは、約2個～約3個の整数であり；そして

kは、1個～約3個の整数である；

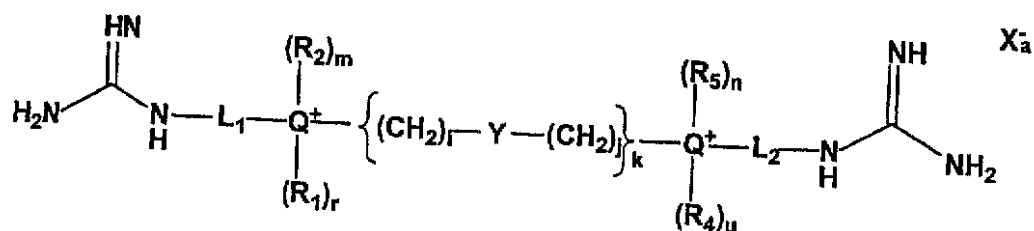
【0060】

【化84】

40

50

(A6)



10

ここで、

Q、R₁、R₄、r、u、mおよびnは、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、H、およびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

iおよびjは、約2個～約3個の整数であり；

kは、1個～約3個の整数であり；

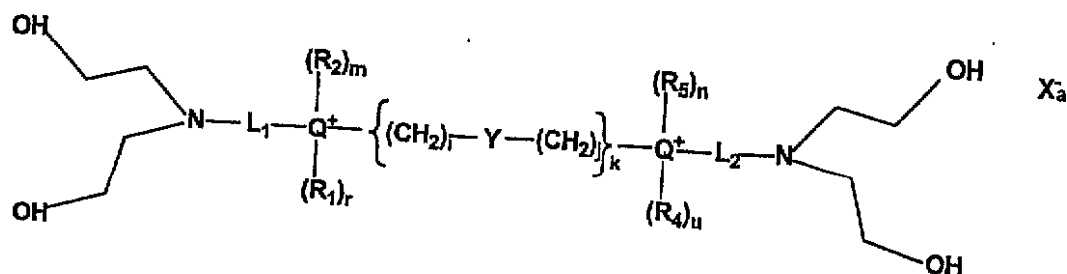
20

L₁およびL₂は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そしてYは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される；

【0061】

【化85】

(A7)



30

ここで、

Q、R₁、R₄、r、u、mおよびnは、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、H、およびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

40

iおよびjは、約2個～約3個の整数であり；

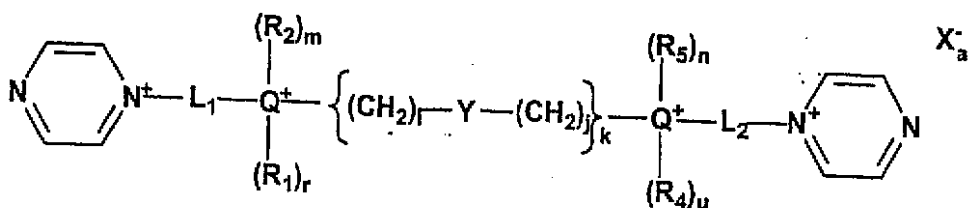
kは、1個～約3個の整数であり；

L₁およびL₂は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そしてYは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される；

【0062】

【化86】

(A8)



10

ここで、

Q、R₁、R₄、r、u、mおよびnは、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、H、およびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

iおよびjは、約2個～約3個の整数であり；

kは、1個～約3個の整数であり；

20

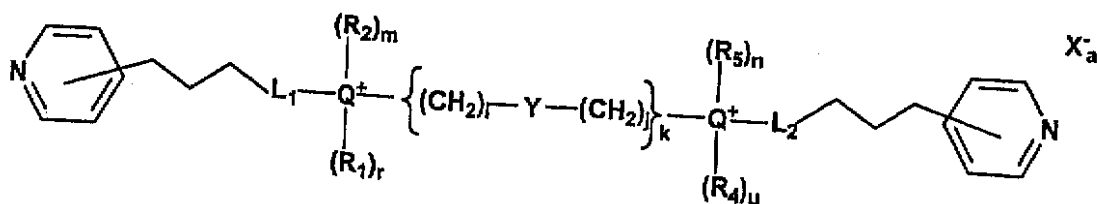
L₁およびL₂は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

Yは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される；

【0063】

【化87】

(A9)



30

ここで、

Q、R₁、R₂、r、u、mおよびnは、上記に定義される通りであり；

R₂およびR₅は、互いに独立して、HおよびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

40

iおよびjは、約2個～約3個の整数であり；

kは、1個～約3個の整数であり；

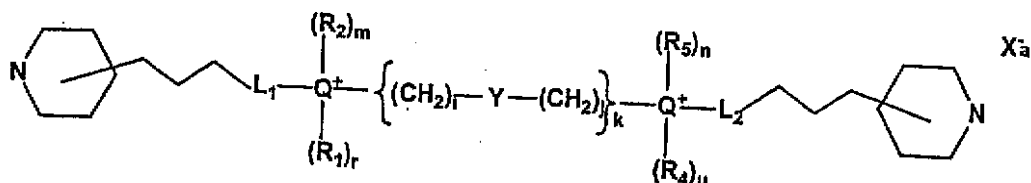
L₁およびL₂は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

Yは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される；ならびに

【0064】

【化88】

(A10)



ここで、

Q、R₁、R₄、r、u、m、およびnは、上記に定義される通りであり、

R₂およびR₅は、互いに独立して、HおよびC₁～C₈アルキル、アルケニル、アリール、ならびに必要に応じて1つ以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で置換されるアルキルからなる群から選択され；

i および j は、約2～約3の整数であり；

k は、1～約3の整数であり；

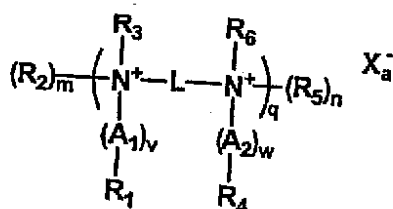
L₁およびL₂は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そしてYは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される。

【0065】

また、本発明の化合物は、式(B)を有する：

【0066】

【化89】



Lは、(CH₂)₁、または{(CH₂)_i - Y - (CH₂)_j}_kであり、ここでYは、CH₂、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カーボネート、および第二級アミノ基からなる群から選択され；

R₁～R₆は、互いに独立して、H、-(CH₂)_p-Z、アルキル、アルケニル、アリール、および必要に応じて1つ以上のアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そしてR₁、R₃、R₄およびR₆の少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり、そしてR₁、R₃、R₄およびR₆のいずれか1つ以上が必要に応じて、互いに共有結合して環式部分を形成し得；

Zは、アミン、スペルミル、カルポキシスペルミル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ピペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

A₁およびA₂は、互いに独立して、CH₂O、CH₂S、CH₂NH、C(O)、C(NH)、C(S)および(CH₂)_tからなる群から選択され；

Xは、生理学的に受容可能なアニオンであり；

m、n、vおよびwは、0または1であり；

i、j、k、l、pおよびtは、1～約100の整数であり；

qは、1～約1000の整数であり；そして

aは、上記アニオンの価数によって除算された正電荷の数であり、ここで、mおよびnが0である場合、aは0である。

【0067】

好ましくは、 $R_1 \sim R_6$ 、i、j、k、l、p、t、q、bおよびcは、式(A)に関して定義される通りである。

【0068】

好ましくは、Yは、 CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択される。

10

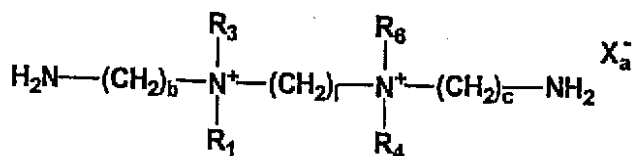
【0069】

式(B)の範囲内にある有用な化合物は、以下の式を有する化合物を包含する：

【0070】

【化90】

(B1)



20

ここで、

R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 が、互いに独立して、Hおよび C_1-C_8 アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；そして

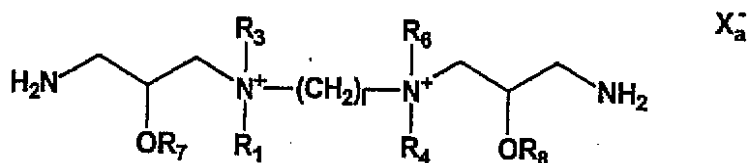
30

l、bおよびcが、1～約4から独立して選択される整数である；

【0071】

【化91】

(B2)



40

ここで、

R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 が、互いに独立して、Hおよび C_1-C_8 アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され、そして R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を

50

有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

R_7 および R_8 は、独立して、Hまたは炭水化物であり；そして

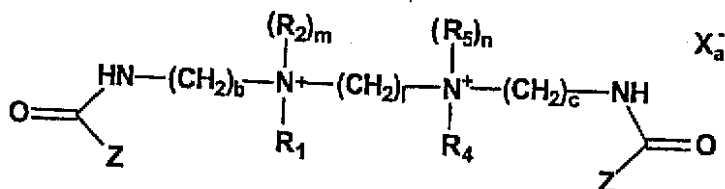
1が、1～約4の整数である；

【0072】

【化92】

(B3)

10



ここで、

R_1 、 R_2 、 R_4 および R_5 が、互いに独立して、Hおよび C_1-C_8 アルキル、アルケニル、アリール、ならびにアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され、そして R_1 、 R_2 、 R_4 および R_5 のうち少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

20

Zが、スペルミイル、スペルミジイル、アミノ酸、ペプチジル、ジアミノアルキル、およびポリアミンからなる群から選択され；

mおよびnは、0または1であり；そして

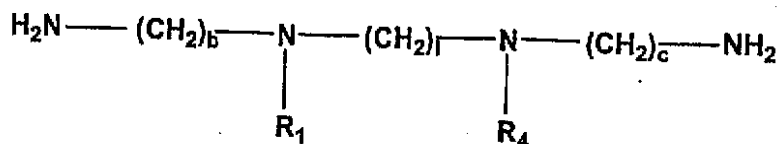
1、bおよびcが、1～約4から独立して選択される整数である；

【0073】

【化93】

30

(B4)



ここで、

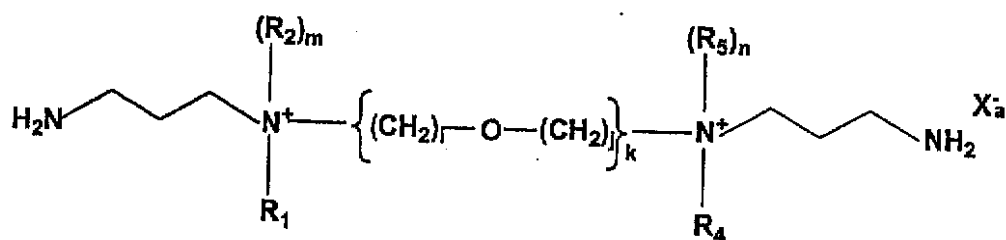
R_1 および R_4 のうちの少なくとも1つが、約8～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；そして1、bおよびcが、独立して、1～約4から選択される整数である；

40

【0074】

【化94】

(B7)



10

ここで、

R_1 および R_4 の少なくとも1個は、約8個～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hおよび $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

i および j は、約2個～約3個の整数であり；そして

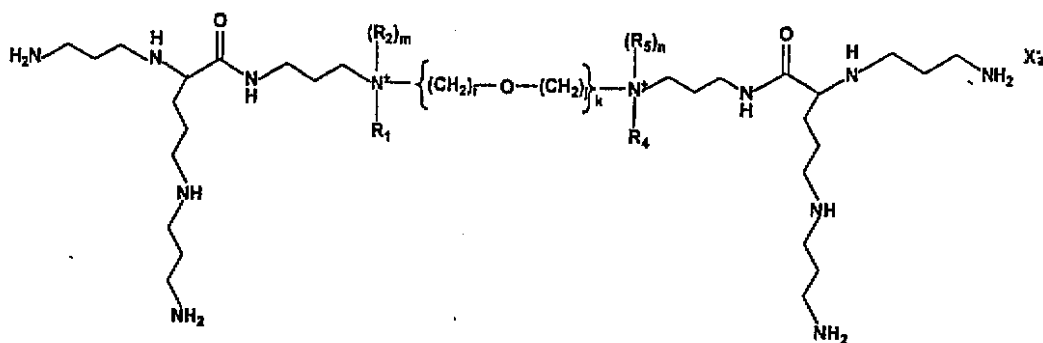
k は、1個～約3個の整数である；

【0077】

【化97】

20

(B8)



30

ここで、

R_1 および R_4 の少なくとも1個は、約8個～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hおよび $\text{C}_1\sim\text{C}_8$ アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

i および j は、約2個～約3個の整数であり；そして

k は、1個～約3個の整数である；

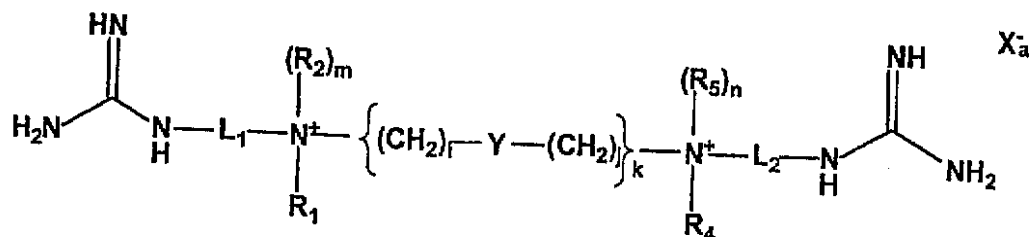
【0078】

【化98】

40

50

(B9)



10

ここで、

R_1 および R_4 の少なくとも1個は、約8個～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hおよび $C_1 \sim C_8$ アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

20

i および j は、約2個～約3個の整数であり；

k は、1個～約3個の整数であり；そして

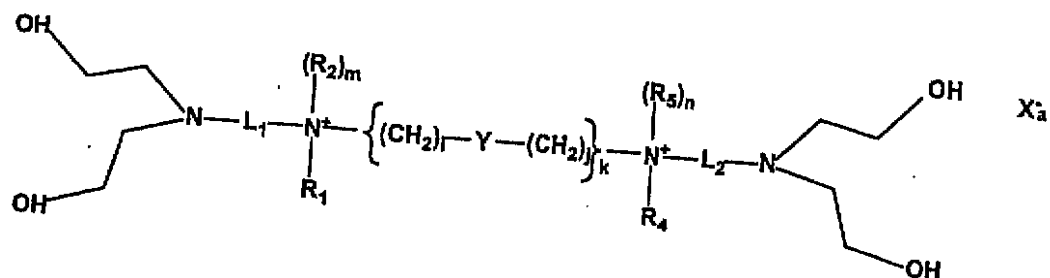
L_1 および L_2 は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

Y は、 CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択される；

【0079】

【化99】

(B10)



30

ここで、

R_1 および R_4 の少なくとも1個は、約8個～約24個の炭素原子を有する、直鎖または分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニル、またはアリール基であり；

40

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hおよび $C_1 \sim C_8$ アルキル、アルケニル、アリール、ならびに1個以上のアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基で必要に応じて置換されているアルキルからなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

i および j は、約2個～約3個の整数であり；

k は、1個～約3個の整数であり；そして

L_1 および L_2 は、互いに独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

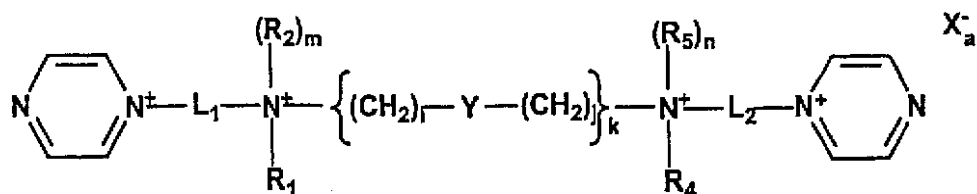
Y は、 CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択される；

50

【0080】

【化100】

(B11)



10

ここで、

R_1 および R_4 のうちの少なくとも1つが、約8個～約24個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hならびに $C_1 \sim C_8$ アルキル、アルケニル、アリール、およびアルキル（必要に応じて、アルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基の1つ以上によって置換される）からなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

i および j は、約2～約3の整数であり；

k は、1～約3の整数であり；

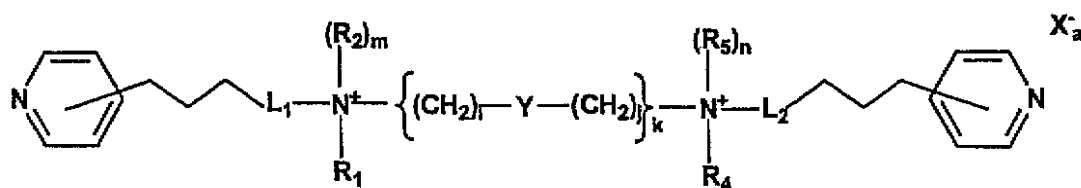
L_1 および L_2 は、互いから独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

Y は、 CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択され；

【0081】

【化101】

(B12)



30

ここで、

R_1 および R_4 のうちの少なくとも1つが、約8個～約24個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、Hならびに $C_1 \sim C_8$ アルキル、アルケニル、アリール、およびアルキル（必要に応じて、アルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基の1つ以上によって置換される）からなる群から選択され；

m および n は、0または1であり；

i および j は、約2～約3の整数であり；

k は、1～約3の整数であり；

L_1 および L_2 は、互いから独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

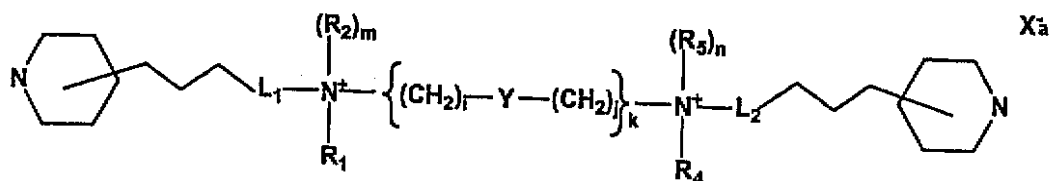
Y は、 CH_2 、O、SおよびNHからなる群から選択され；そして

【0082】

50

【化 1 0 2】

(B13)



10

ここで、

R_1 および R_4 のうちの少なくとも 1 つが、約 8 個～約 24 個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

R_2 および R_5 は、互いに独立して、H ならびに $C_1 \sim C_8$ アルキル、アルケニル、アリール、およびアルキル（必要に応じて、アルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基の 1 つ以上によって置換される）からなる群から選択され；

m および n は、0 または 1 であり；

i および j は、約 2 ～約 3 の整数であり；

20

k は、1 ～約 3 の整数であり；

L_1 および L_2 は、互いから独立して、アルキレンまたはアルキレンエーテルであり；そして

Y は、 CH_2 、O、S および NH からなる群から選択される。

【0083】

式 (B1) ～ (B13) のそれぞれにおいて、好ましくは、 R_1 および R_4 は、それぞれ、 C_{6-30} アルキルまたはアルケニル、より好ましくは、 C_{8-24} アルキルまたはアルケニルであり、そして R_2 および R_5 または R_3 および R_6 は、それぞれ水素または C_{1-8} アルキルである。

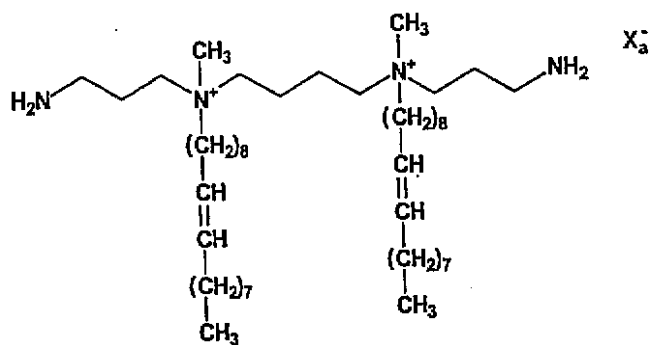
【0084】

30

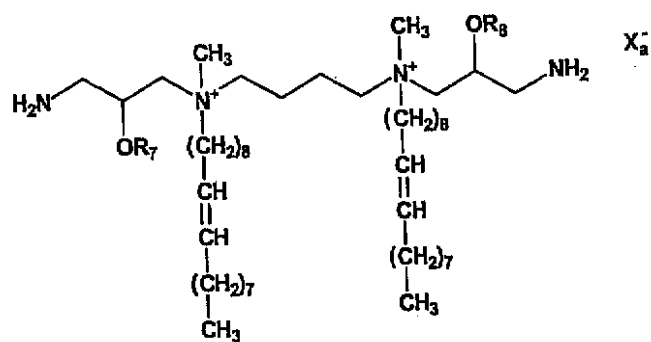
本発明の範囲の特定の化合物は、以下の例を含む。式中の R_7 および R_8 は独立して、H または炭水化物であり、好ましくは H である。

【0085】

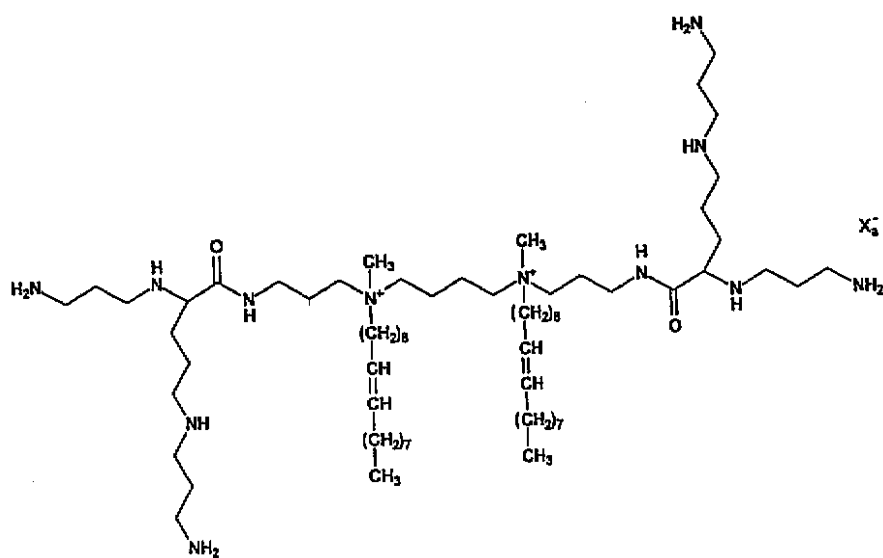
【化 1 0 3】



10



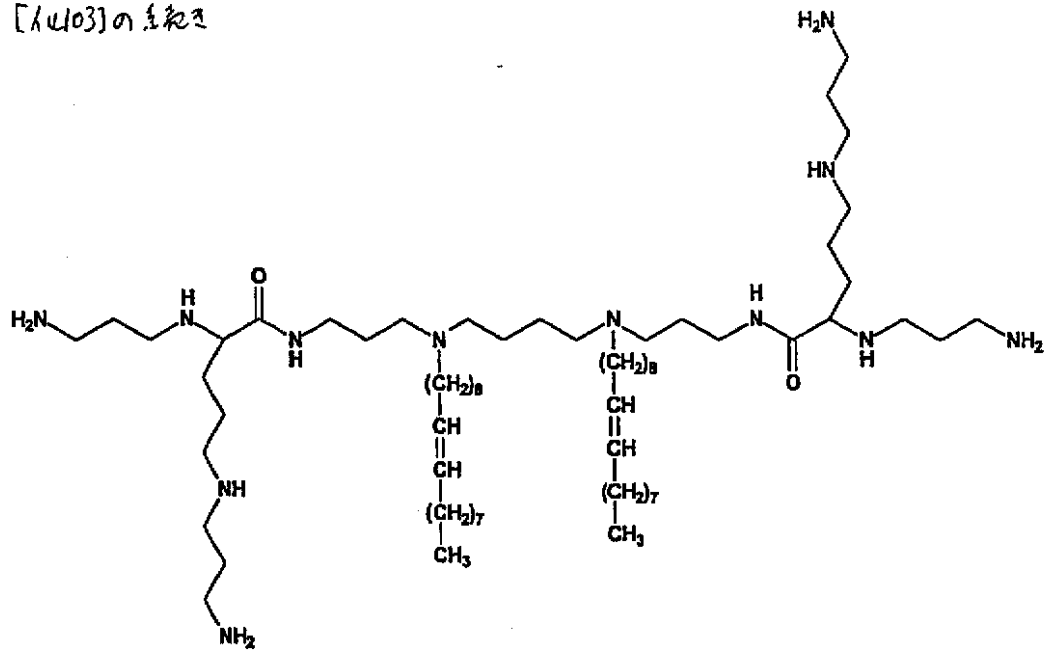
20



30

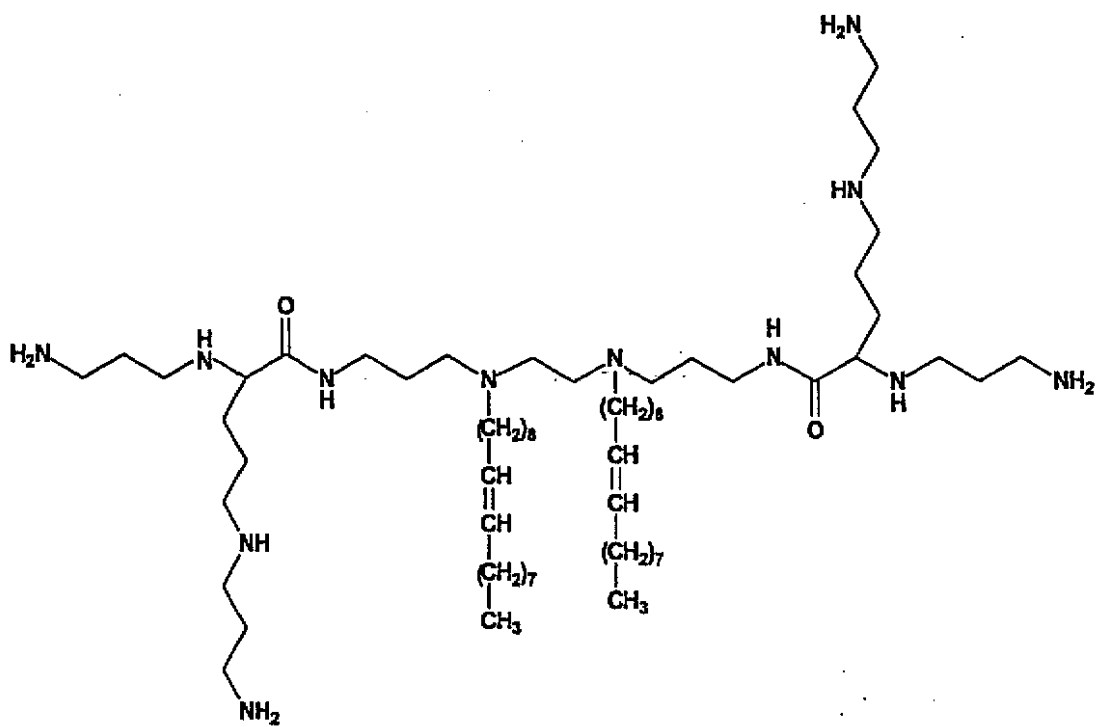
40

[化103]の化学式



10

20



30

40

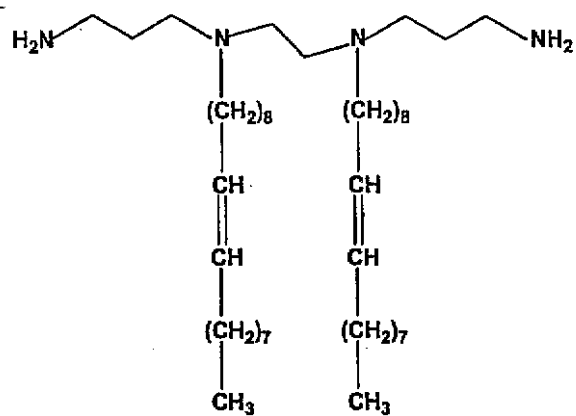
[化103]の構造

Chemical structure of a poly(arylether)sulfonate copolymer. The backbone consists of repeating units: a 4,4'-biphenylene unit with two sulfonate groups ($-\text{SO}_3\text{R}_7$) and a 4,4'-biphenylene unit with two sulfonate groups ($-\text{SO}_3\text{R}_8$). The side chains are: a 4-aminobutyl group ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), a 4-aminobutyl group ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), and a 4-aminobutyl group ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$). The structure is shown with various substituents like OR_7 , OR_8 , and X_n^- .

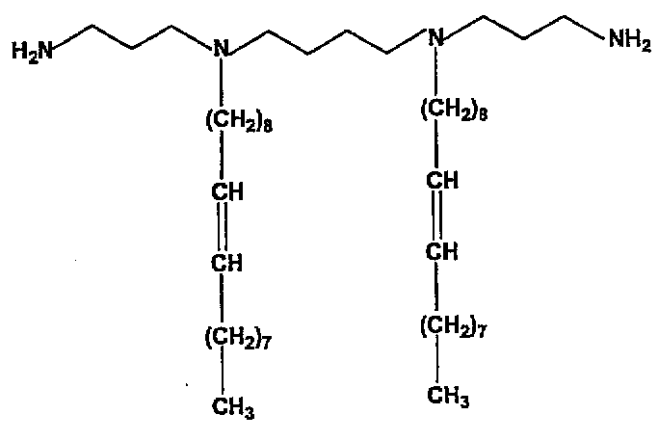
NCCCCNC(=O)C(CCCN)C(=O)NCC(OR7)CNC(CCCN)C(=O)NCC(OR8)C(CCCN)C(=O)NCCCCN[illegible]

40

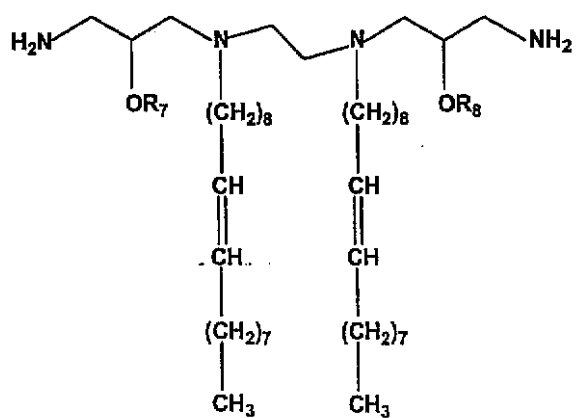
[化103]の化合物



10



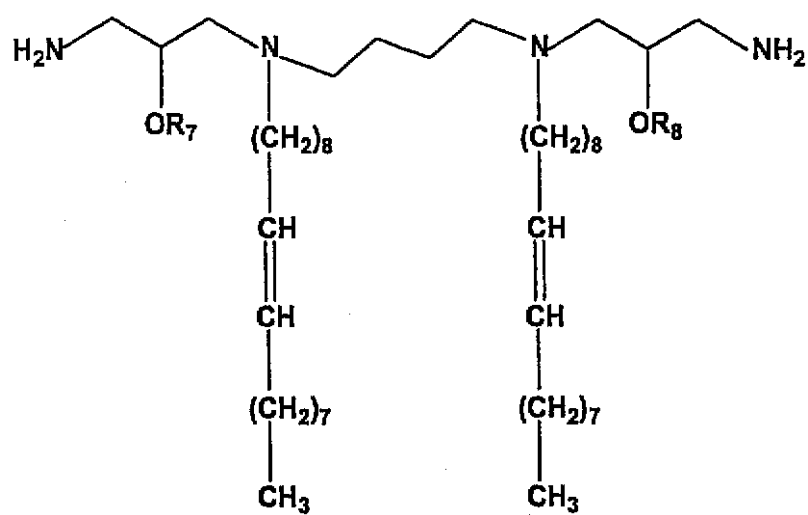
20



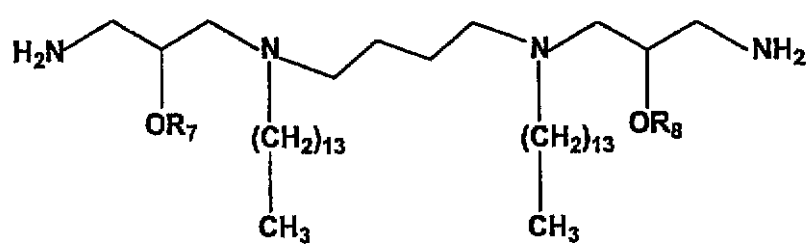
30

40

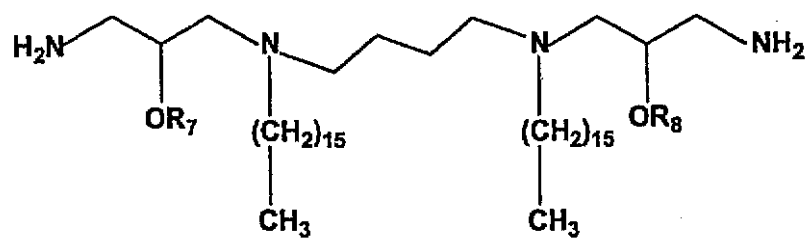
[化103]の全構造



10

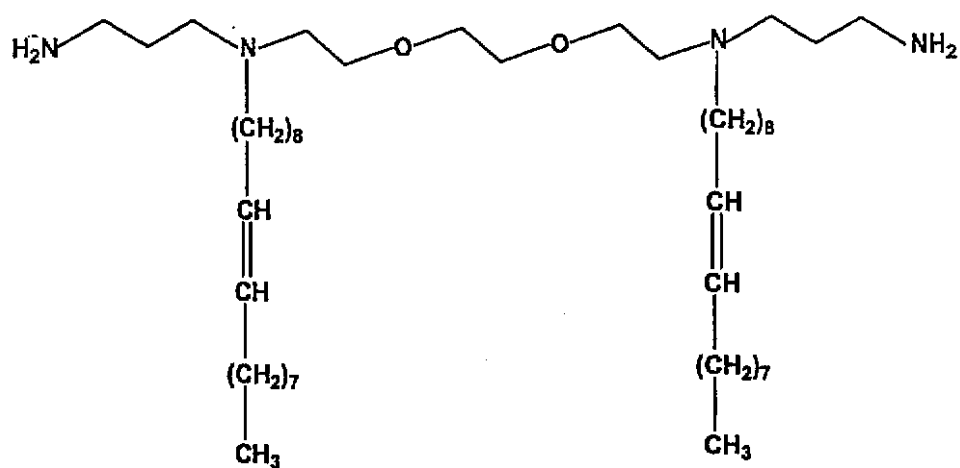


20

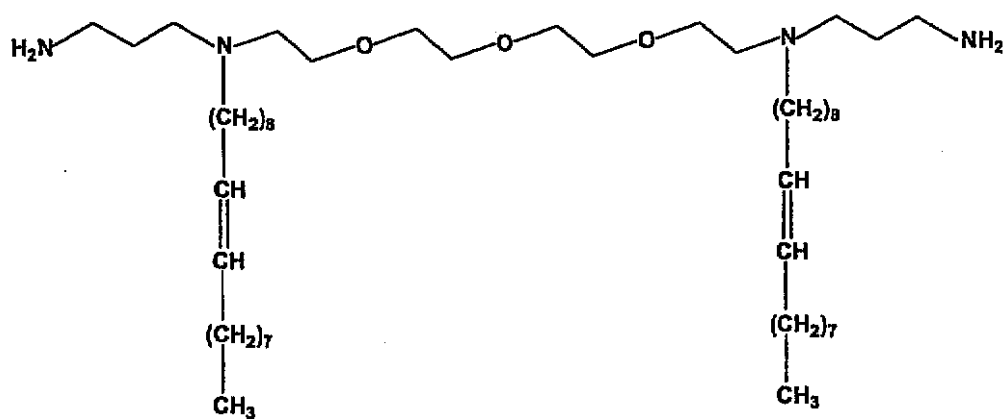


30

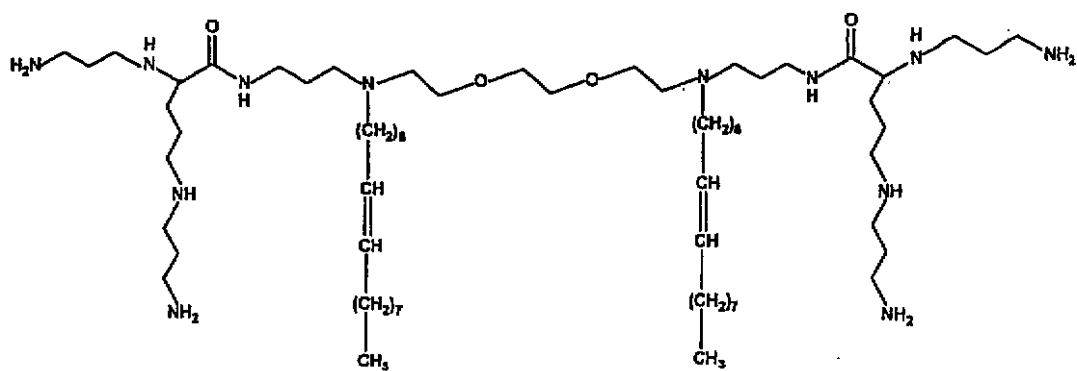
[化03]の系を



10



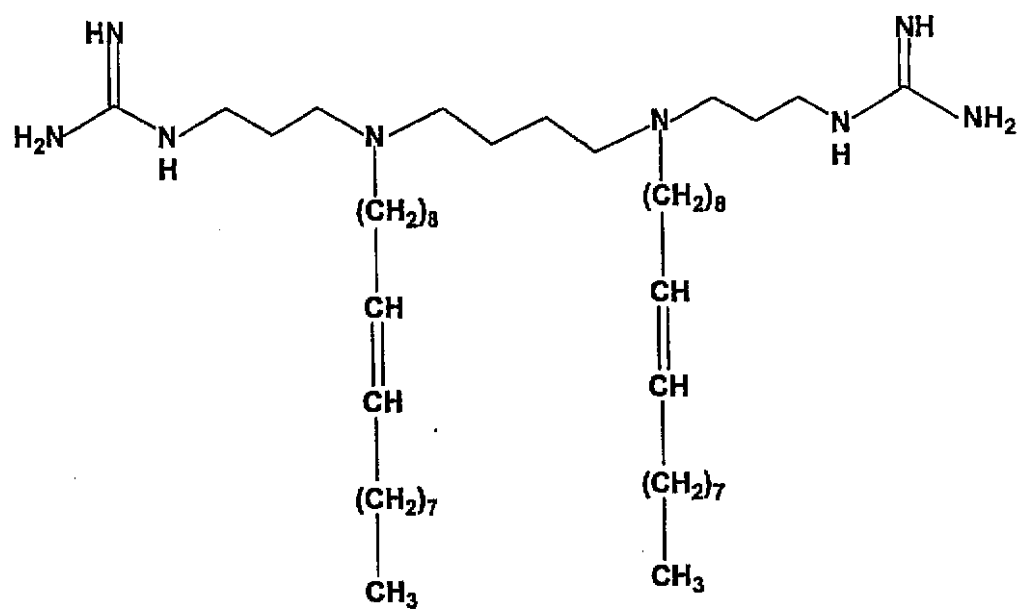
20



30

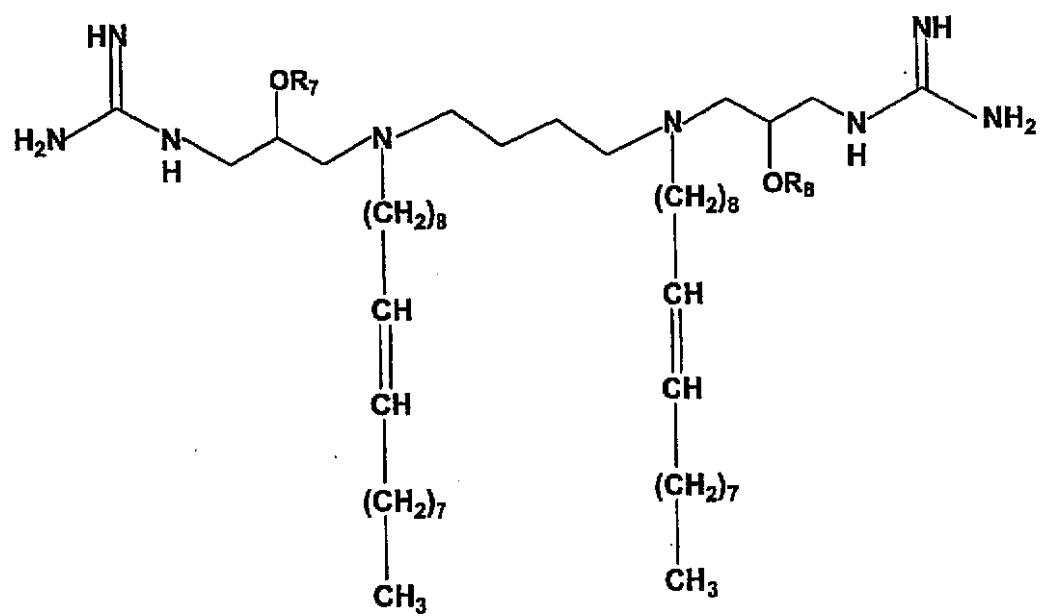
40

[化103] a 3-2 2



10

20

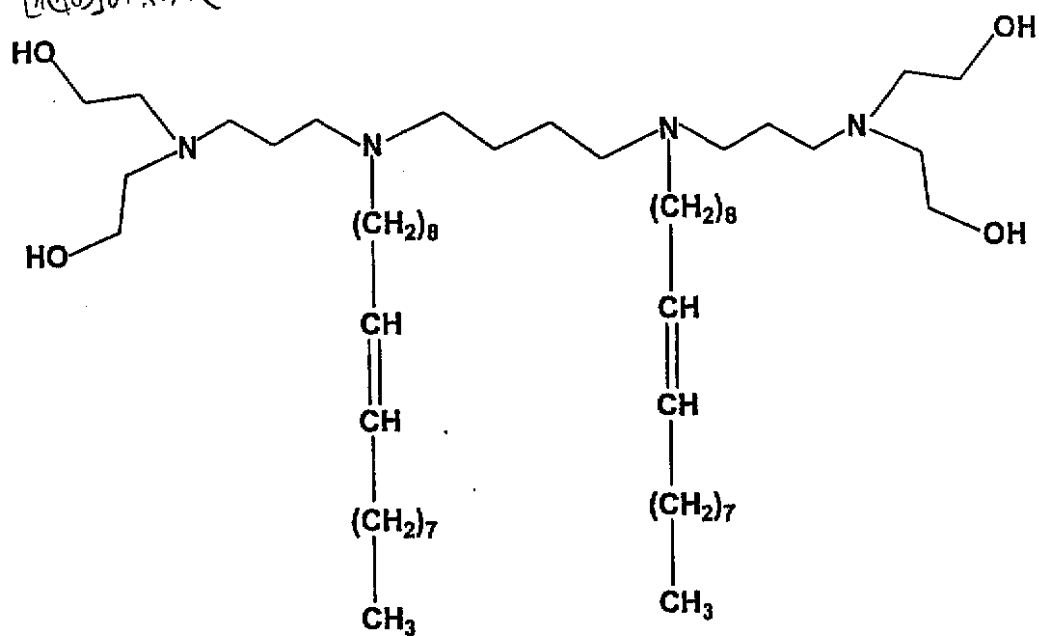


30

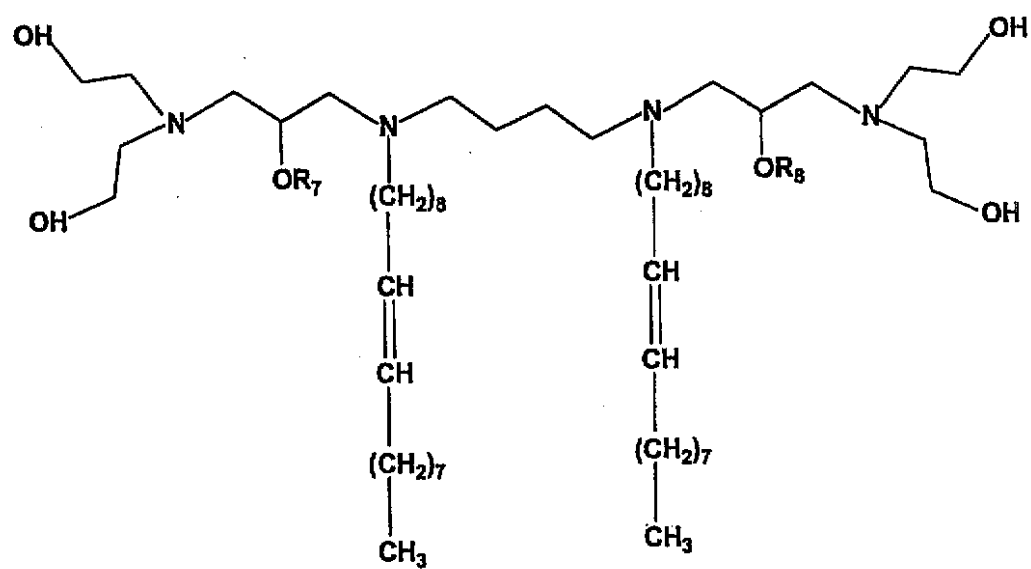
40

NC(=N)NCCCCN(CCCCCC/C=C/CCCCC)CCOCCOCCN(CCCCCC/C=C/CCCCC)CCCCNC(=N)NC[N+](C)(C)CCCC[N+](C)(C)CCCC[N+](C)(C)CCCC[N+](C)(C)CCCCC=C/C=C/C=C/C=C/C=C/C=C/C x_a^-

[化03]の系統



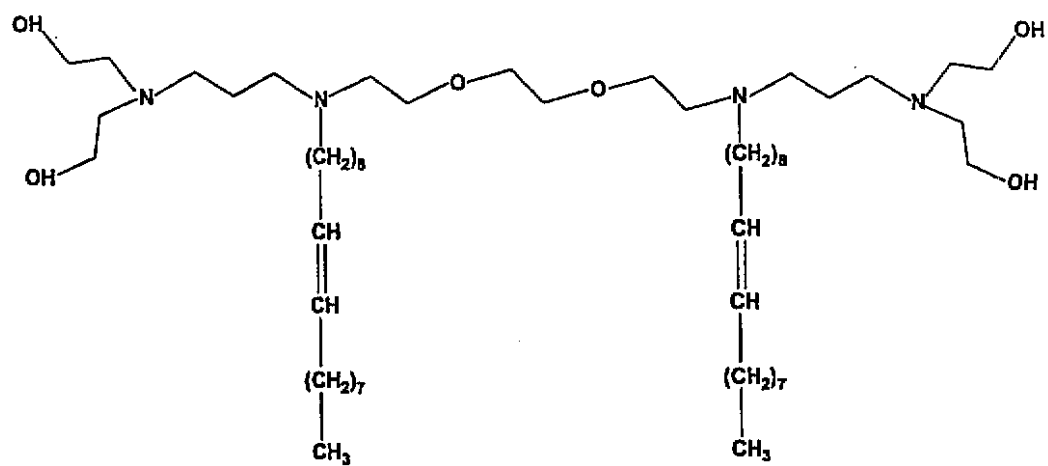
10



20

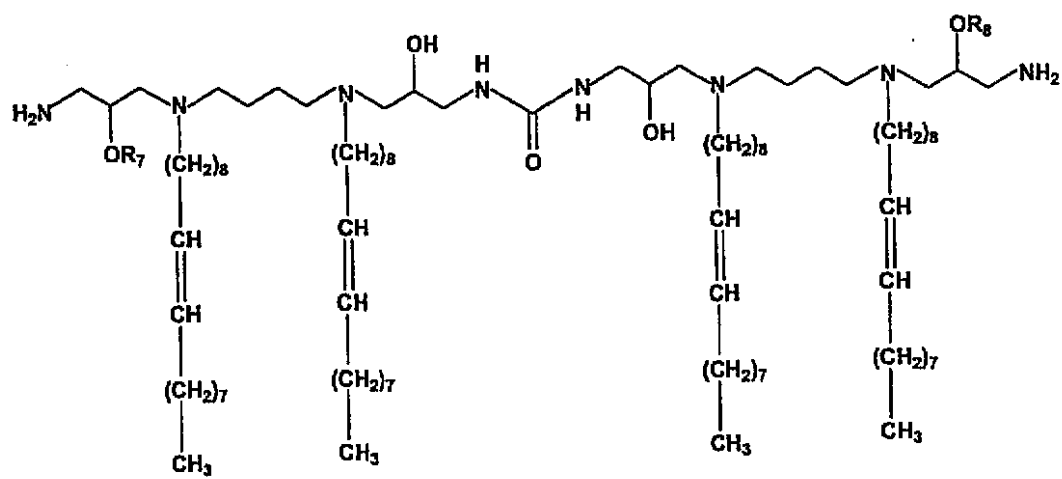
30

[1403]の化合物



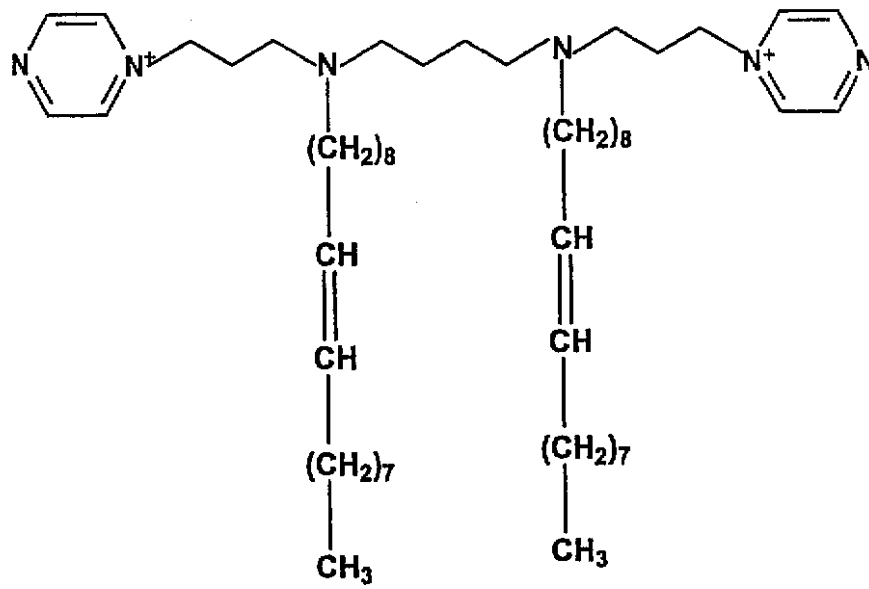
10

20



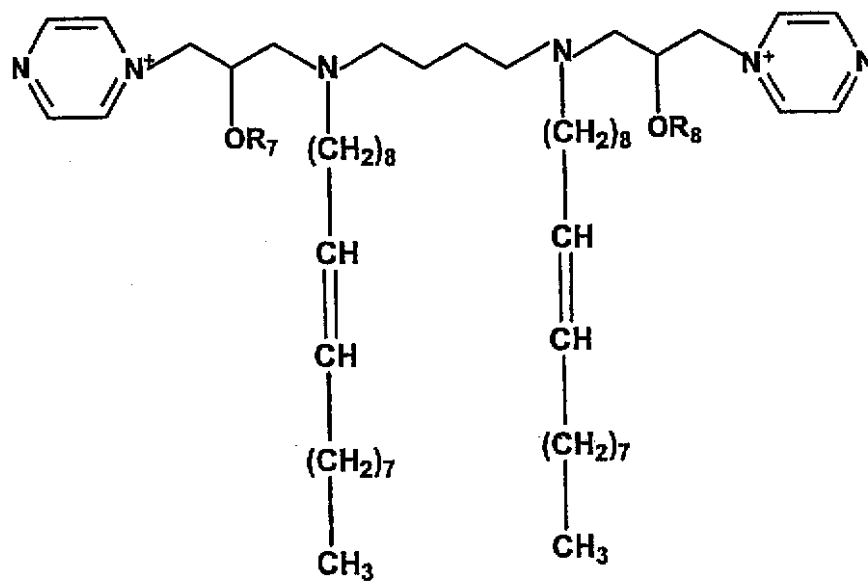
30

[1403] の系 2



10

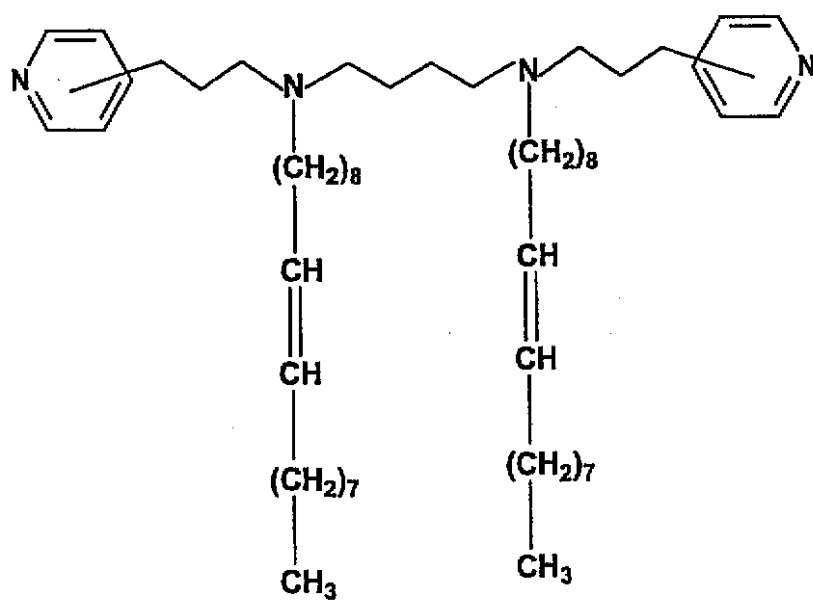
20



30

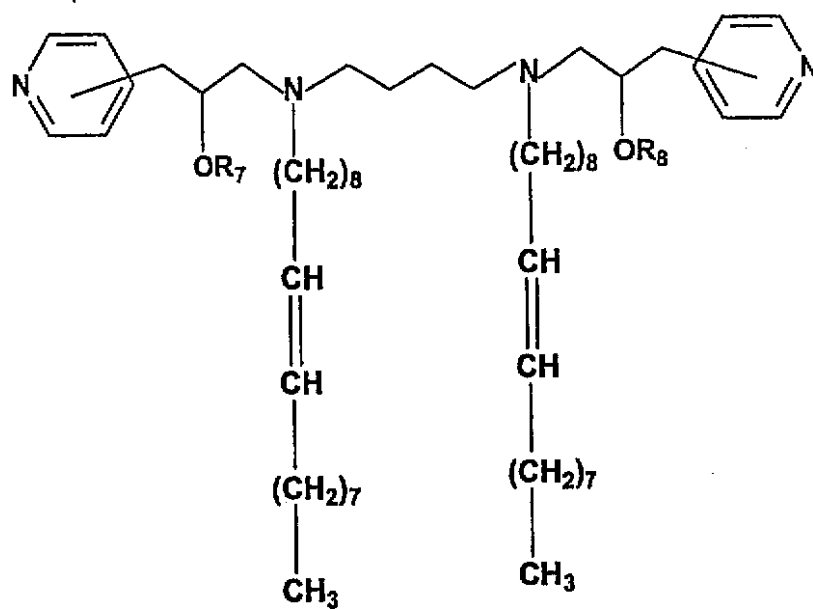
Chemical structure of a bis-pyridinium lipid molecule. The molecule consists of two pyridinium rings, each with a positive charge (N⁺), connected by a long chain. The chain includes two tertiary amine groups (N) and two ether linkages (O). Each tertiary amine is also bonded to a long alkyl chain (CH₂)₈ and a shorter alkyl chain (CH₂)₇, which is terminated by a methyl group (CH₃). The ether linkages are labeled OR₇ and OR₈.

20



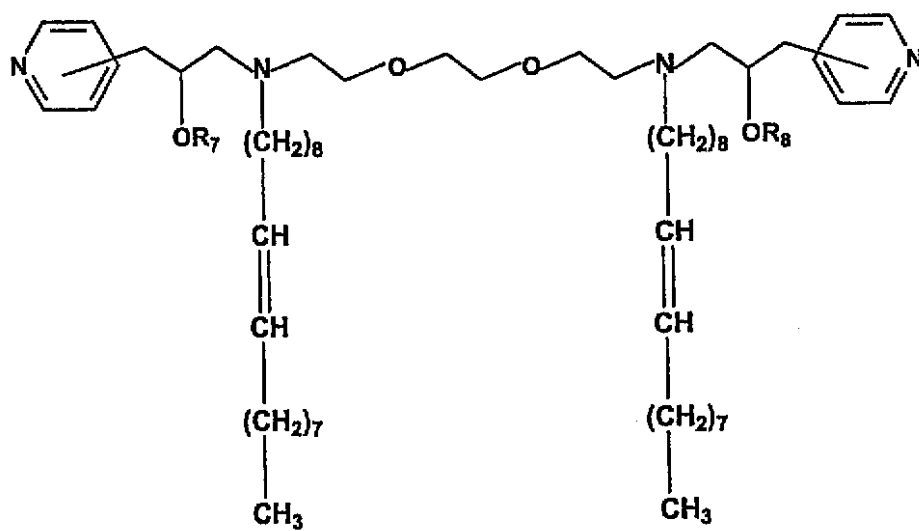
40

[化03]の1式



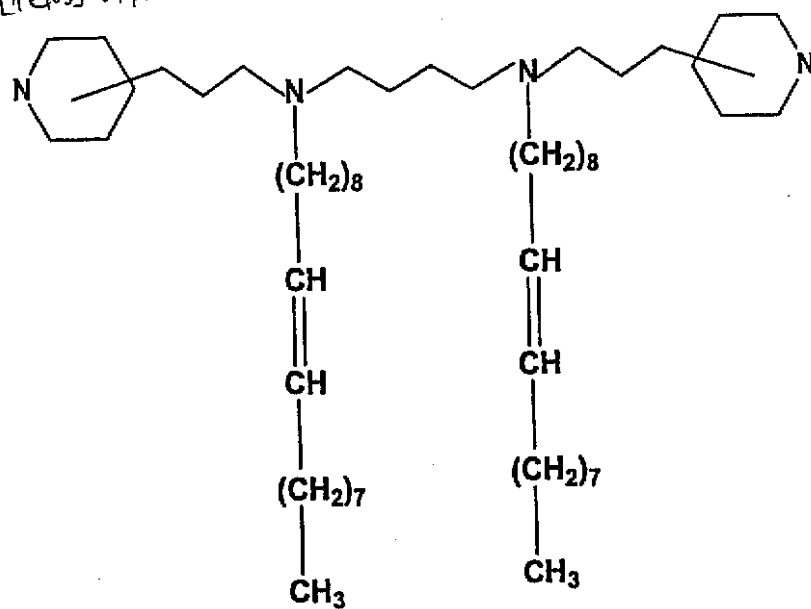
10

20



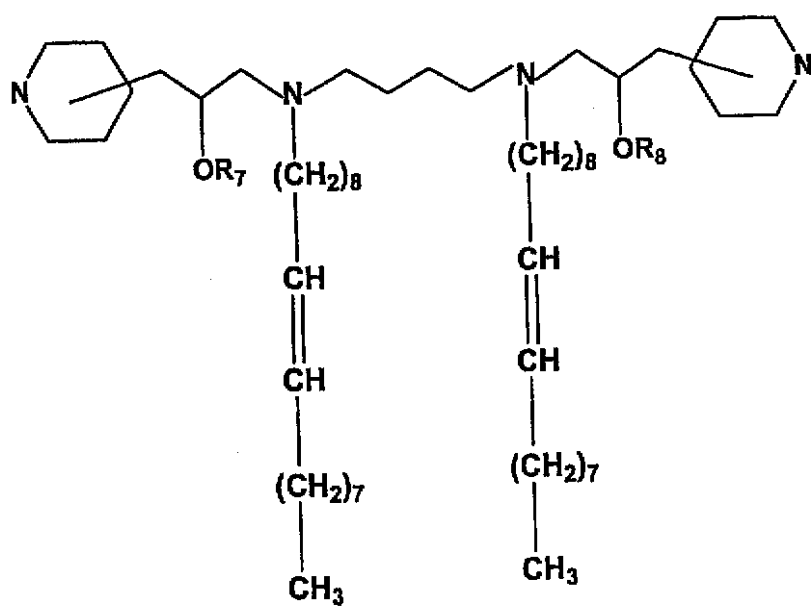
30

[化103]の系統式

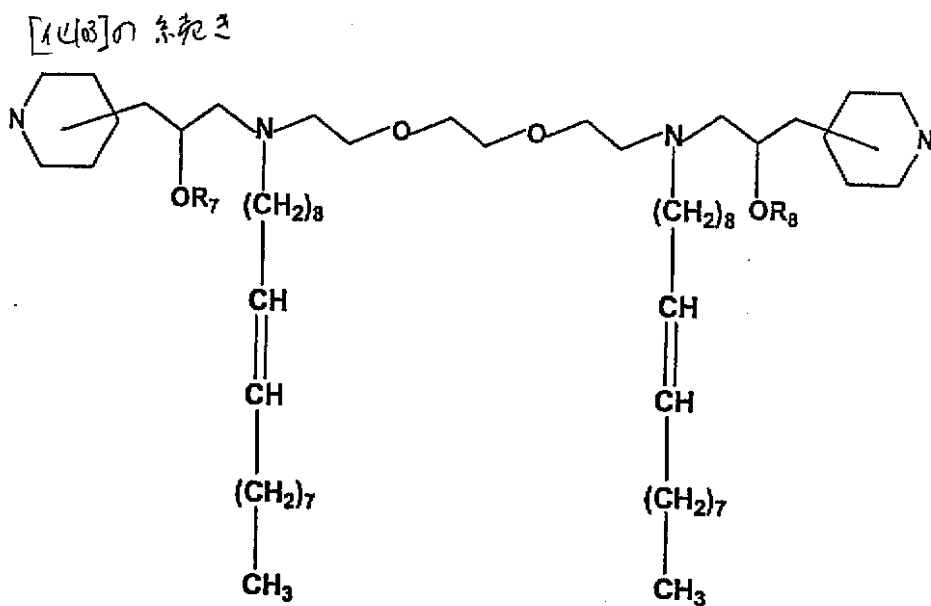


10

20

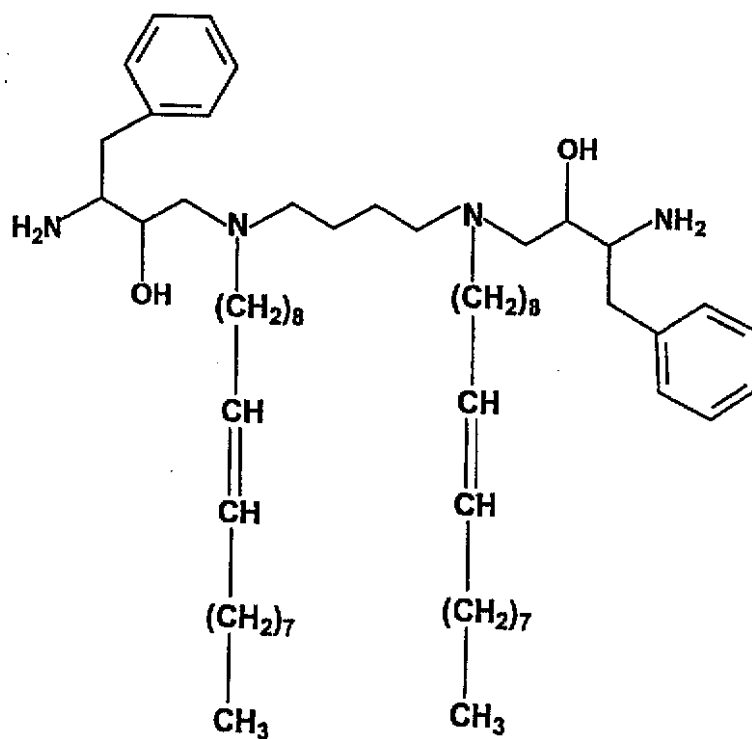


30



10

20



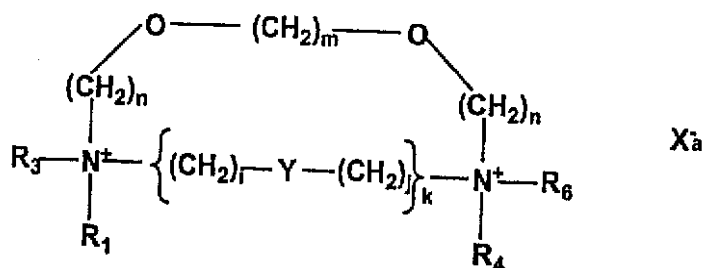
30

40

さらに、本発明に従う化合物は、以下の式（C）を有する：

【0086】

【化104】



ここで、

Yは、CH₂、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニル、および2級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、Yは、 $-X_1-L'-X_2-Z$ または $-Z$ によって必要に応じて置換され；

R₁、R₃、R₄およびR₆は、互いに独立して、H、 $-(CH_2)_p-D-Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、およびアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして、R₁、R₃、R₄およびR₆のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり、そしてR₁、R₃、R₄およびR₆が、互いにまたはYと、必要に応じて共有結合され得て、環式部分を形成し得；

Zは、アミン、スペルミイル、カルボキシスペルミイル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ペリリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

X₁およびX₂は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L'は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

Dは、Qまたは結合であり；

mおよびnは、0または1であり；そして

i、j、k、lおよびpは、独立して1～約10から選択される整数である。

【0087】

好ましくは、Yは、CH₂、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、および2級アミノ基からなる群から選択される。

【0088】

好ましくは、R₁、R₃、R₄およびR₆は、互いに独立して、H、 $-(CH_2)_p-Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、およびアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして、R₁、R₃、R₄およびR₆のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり、そしてR₁、R₃、R₄およびR₆が、互いに必要に応じて共有結合され得て、環式部分を形成し得る。

【0089】

好ましくは、R₁およびR₄のうちの少なくとも1つが、約2個～100個、好ましくは4個～75個、より好ましくは、6個～64個、より好ましくは、8個～50個、より好ましくは、8個～40個、より好ましくは、8個～30個、より好ましくは6個～30個、

より好ましくは4個～30個、そして最も好ましくは8個～約24個の炭素原子を有する直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基である。

【0090】

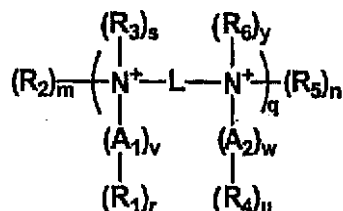
好ましくは、Yは、CH₂、O、SおよびNHからなる群から選択される。

【0091】

本発明の化合物およびポリカチオンは、以下の式(D)を有する：

【0092】

【化105】



ここで、

Lは、C、CH、(CH₂)₁、または{(CH₂)_i-Y-(CH₂)_j}_kであり、ここで
Yは、CH₂、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、ホスフェート、スルフェート、スルホキシド、イミン、カルボニル、および2級アミノ基からなる群から選択され、そしてここで、Yは、-X₁-L'-X₂-Zまたは-Zによって必要に応じて置換され；

R₁～R₆は、互いに独立して、H、-(CH₂)_p-D-Z、アルキル、アルケニル、アリール、およびアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、アルキルチオ、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そしてここで、R₁、R₃、R₄およびR₆のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；

Zは、アミン、スペルミイル、カルボキシスペルミイル、グアニジル、スペルミジニル、プトリシニル、ジアミノアルキル、ピリジル、ペペリジニル、ピロリジニル、ポリアミン、アミノ酸、アミノ酸誘導体、ペプチド、およびタンパク質からなる群から選択され；

X₁およびX₂は、互いに独立して、NH、O、S、アルキレン、およびアリーレンからなる群から選択され；

L'は、アルキレン、アルケニレン、アルキニレン、アリーレン、アルキレンエーテル、およびポリエーテルからなる群から選択され；

A₁およびA₂は、互いに独立して、CH₂O、CH₂S、CH₂NH、C(O)、C(NH)、C(S)および(CH₂)_tからなる群から選択され；

m、n、r、s、u、v、wおよびyは、0または1であり、但し、mおよびnの両方が0である場合、r、s、uおよびyのうちの少なくとも1つが、0ではなく；

i、j、k、l、pおよびtは、0～約100の整数であり；

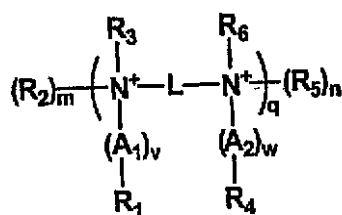
qは、1～約1000の整数である。

【0093】

また、本発明の化合物およびポリカチオンは、以下の式(E)を有する：

【0094】

【化106】



ここで、

Lは、 $(CH_2)_1$ または $\{(CH_2)_i - Y - (CH_2)_j\}_k$ であり、ここで、Yは、 CH_2 、エーテル、ポリエーテル、アミド、ポリアミド、エステル、スルフィド、ウレア、チオウレア、グアニジル、カルバモイル、カルボネート、および2級アミノ基からなる群から選択され；

$R_1 \sim R_6$ は、互いに独立して、H、 $-(CH_2)_p - Z$ 、アルキル、アルケニル、アリール、およびアルコール、アミノアルコール、アミン、アミド、エーテル、ポリエーテル、ポリアミド、エステル、メルカプタン、ウレア、チオウレア、グアニジル、またはカルバモイル基のうちの1つ以上によって必要に応じて置換されるアルキルまたはアルキルエーテルからなる群から選択され、そして、 R_1 、 R_3 、 R_4 および R_6 のうちの少なくとも1つが、直鎖もしくは分枝鎖、環式の、アルキル、アルケニル、アルキニルまたはアリール基であり；Z、 A_1 、 A_2 、m、n、i、j、k、l、p、tおよびqが上記のように定義される。

【0095】

上記式(D)および(E)において、 $R_1 \sim R_6$ 、Y、i、j、k、l、p、tおよびqは、好ましくは、式(A)に関して定義される通りである。

【0096】

QがOまたはSである場合、置換基の数は、その価数に従うべきであることは、当業者に明らかである。

【0097】

本発明の特定の化合物は、送達方法およびトランスフェクション方法のために使用するための生理学的媒体に、不十分な溶解性であり得る。当業者は、水性媒体におけるこのような化合物の溶解性を高めるための、当該分野で利用可能な種々の技術が存在することを理解する。このような方法は、本明細書中に記載される化合物に対して過度の実験なしに容易に適用可能である。

【0098】

(定義)

有用なアリール基は、 C_{6-100} アリール、好ましくは C_{6-75} アリール、より好ましくは C_{6-64} アリール、より好ましくは C_{6-50} アリール、より好ましくは C_{6-40} アリール、より好ましくは C_{6-30} アリール、最も好ましくは C_{6-24} アリールである。典型的な C_{6-100} アリール基には、フェニル、ナフチル、フェナントリル、アントラシル、インデニル、アズレニル、ビフェニル、ビフェニレニル、フルオレニル、ピレニル、アセアントレニル、コラントレニル、アセフェナントレニル、ビオランテレニル(violanthrenyl)、ヘキサフェニル、ヘキサアセニル(hexacenyl)、トリナフチル、およびピランチル(pyranthyl)基が挙げられる。

【0099】

有用なアルキル基は、直鎖または分枝鎖の C_{2-100} アルキル基、好ましくは C_{4-75} アルキル、より好ましくは C_{6-64} アルキル、より好ましくは C_{8-50} アルキル、より好ましくは C_{8-40} アルキル、より好ましくは C_{8-30} アルキル、より好ましくは C_{6-30} アルキル、より好ましくは C_{4-30} アルキル、最も好ましくは C_{8-24} アルキルである。典型的には C_{2-100} アルキル基には、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、sec.-ブチル、tert

、ブチル、ペンチル、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、エイコシル、ドコシル、テトラコシル、ヘキサコシル、オクタコシル、およびトリアコンチル基が挙げられる。また、本発明の化合物の任意のベンゼン環の2つの隣接する位置上で置換されるトリメチレン基も考慮される。

【0100】

有用なアルケニル基は、直鎖または分枝鎖の C_{2-100} アルケニル、好ましくは C_{4-75} アルケニル、より好ましくは C_{6-64} アルケニル、より好ましくは C_{8-50} アルケニル、より好ましくは C_{8-40} アルケニル、より好ましくは C_{8-30} アルケニル、より好ましくは C_{6-30} アルケニル、より好ましくは C_{4-30} アルケニル、最も好ましくは C_{8-24} アルケニルである。典型的には C_{2-100} アルケニル基には、エチニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、sec-ブテニル、ヘキセニル、オクテニル、デセニル、ドデセニル（特に9-ドデセニル）、テトラデセニル（特に9-テトラデセニル）、ヘキサデセニル（特に9-ヘキサデセニル）、オクタデセニル（特に9-オクタデセニル）、エイコセニル、ドコセニル、テトラコセニル、ヘキサコセニル、オクタコセニル、およびトリアコンテニルが挙げられる。

10

【0101】

有用なアルキニル基は、直鎖または分枝鎖の C_{2-100} アルキニル、好ましくは C_{4-75} アルキニル、より好ましくは C_{6-64} アルキニル、より好ましくは C_{8-50} アルキニル、より好ましくは C_{8-40} アルキニル、より好ましくは C_{8-30} アルキニル、より好ましくは C_{6-30} アルキニル、より好ましくは C_{4-30} アルキニル、最も好ましくは C_{8-24} アルキニルである。典型的には C_{2-100} アルキニル基には、エチニル、プロピニル、ブチニル、n-ブチニル、ヘキシニル、オクチニル、デシニル、ドデシニル、テトラデシニル、ヘキサデシニル、オクタデシニル、エイコシニル、ドコシニル、テトラコシニル、ヘキサコシニル、オクタコシニル、およびトリアコンチニル基が挙げられる。

20

【0102】

典型的なアルキルエーテル基には、エーテル基を有する上記 C_{2-100} アルキル基のいずれかを含む。

【0103】

エーテル基は、-O-である。

【0104】

典型的なポリエーテル基は、 $-(CHR^{14}-CH_2-O)_t-$ を含み、ここで、 R^{14} は、Hまたは C_{1-4} アルキル基であり、そしてtは、上に定義された整数であり、好ましくはtは2~5である。

30

【0105】

本発明の目的のために、アミド基は、官能基として-NHC(O)-を有する有機ラジカルである。典型的なアミド基には、アルキルアミド、アルケニルアミド、アルキニルアミド、およびアリールアミドが挙げられ、ここで、アルキル、アルケニル、アルキニル、およびアリールは、上に定義した通りである。

【0106】

典型的なポリアミド基は、上に定義される2種以上のアミド基を有する有機ラジカルを含む。

40

【0107】

典型的には、エステル基は、官能基として-C(O)-O-を有する有機ラジカルである。典型的なエステル基は、 $R^{14}-C(O)-O-R^{15}$ を含み、ここで、 R^{14} および R^{15} は、上に定義するようなアルキレン、アルケニレン、アルキニレンおよびアリーレン基である。

【0108】

典型的には、ウレア基は、官能基として-NH-C(O)-NH-を有する有機ラジカルである。典型的なウレア基は、 $R^{14}NH-C(O)-NHR^{14}$ 、 $R^{14}NH-C(O)-NHR^{15}$ 、 $R^{14}R^{15}N-C(O)-NHR^{14}R^{15}$ を含み、ここで、 R^{14} および R^{15} は、上に定

50

義したようなアルキレン、アルケニレン、アルキニレンおよびアリーレン基である。

【0109】

典型的には、チオウレア基は、上に定義されるウレア基を有する有機ラジカルであり、ここで、ウレア基の酸素が硫黄によって置換される。

【0110】

典型的には、グアニジル基は、官能基として —NH—C(NH)—NH— を有する有機ラジカルである。典型的なグアニジル基は、 $\text{R}^{14}\text{NH—C(NH)—NHR}^{14}$ 、 $\text{R}^{14}\text{NH—C(NH)—NHR}^{15}$ 、および $\text{R}^{14}\text{R}^{15}\text{N—C(NH)—NR}^{14}\text{R}^{15}$ を含み、ここで、 R^{14} および R^{15} は、上に定義したようなアルキレン、アルケニレン、アルキニレンおよびアリーレン基である。

10

【0111】

カルバモイル基は、 —NH—CO— である。

【0112】

典型的には、カルボネート基は、 CO_3^{2-} ラジカル（すなわち —O—C(O)—O— ）を含む有機ラジカルを含む。

【0113】

ホスフェート基は、 PO_4^{3-} ラジカルである。

【0114】

スルフェート基は、 SO_4^{2-} ラジカルである。

【0115】

スルホキッド基は、 —S(O)— である。

20

【0116】

イミン基は、 —C(N)— である。

【0117】

カルボニル基は、 —C(O)— である。

【0118】

第2級アミノ基は、 —NH— である。

【0119】

典型的には、アミノアルコール基は、上に定義される第2級アミノ基とヒドロキシル基の両方を有する有機ラジカルである。典型的なアミノアルコールは、アミノエタノール、アミノプロパノールおよびアミノブタノールを含む。

30

【0120】

定義「Dは結合である」は、DがQでない場合、 $(\text{CH}_2)_p$ とZとの間に単結合が存在することを意味する。

【0121】

生物学的に活性な物質は、インビトロおよび／またはインビボにおいて生物学的効果を及ぼす任意の分子または混合物または分子の複合体を示し、これには、医薬品、薬物、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、ホルモン、ビタミン、ステロイド、ポリアニオン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸（例えば、DNAまたはRNA）、ヌクレオチド、ポリヌクレオチドなどが挙げられる。

40

【0122】

カチオン性脂質は、トランスフェクションに使用し得る任意のカチオン性脂質を示し、これには、DOSPA、DOTMA、DMRIE、DOTAP、DOGSおよびTM-TPSが挙げられるが、これらに限定されない。

【0123】

細胞は、任意の型のかつ任意の供給源由来の真核細胞を示す。真核細胞の型には、一次細胞（primary cell）、腫瘍細胞または不朽化細胞株由来の、上皮細胞、線維芽細胞、ニューロン細胞、造血細胞が挙げられる。このような細胞の供給源には、ヒト、イヌ、マウス、ハムスター、ネコ、ウシ、ブタ、サル（monkey、ape）、ヒツジ、魚、昆虫、真菌のような任意の動物、ならびに作物用植物（crop plant）、

50

装飾用植物および木を含む任意の植物が挙げられる。

【0124】

所望の化合物が標的細胞の内側に、あるいは標的細胞膜の内部にまたはその上に最終的に配置されるように、標的細胞へと所望の化合物を移動 (transfer) させるプロセスを示すために、送達 (delivery) が使用される。本発明の化合物の多くの用途において、所望の化合物は標的細胞に容易に取り込まれず、そして脂質凝集体を介した送達は、所望の化合物を細胞内に入れるための手段である。特定の用途において、特にインビボ条件において、特定の標的細胞型への送達が好ましく、そして本発明の化合物によって促進され得る。

【0125】

薬物とは、ヒトまたは動物の疾患の予防、診断、緩和、処置、もしくは治療に使用される、食物以外の任意の治療剤または予防剤を言う。

【0126】

キットとは、本発明の化合物を1つ以上、またはそれらの混合物を含むトランスフェクションキットもしくはタンパク質発現キットを言う。このようなキットは、運搬手段を含み得、この運搬手段は、1つ以上の容器手段 (例えば、バイアル、試験管など) を緊密に封じ込め (confinement) て受容するように区画化されている。このような容器手段の各々は、トランスフェクションを実施するに必要な成分またはこれらの成分の混合物を含む。このようなキットは、核酸 (好ましくは、1つ以上のベクター)、細胞、1つ以上の本発明の化合物、脂質凝集体形成化合物、トランスフェクションエンハンサー、生物学的に活性な基質などから選択される1つ以上の成分を含み得る。

【0127】

脂質凝集体とは、全ての型 (ユニラメラ (unilamellar) およびマルチラメラ (multilamellar) の両方) のリボソーム、ならびにカチオン性脂質またはリン脂質およびステロイドなどの両親媒性の脂質と混合された脂質のミセルおよびよりアモルファスな凝集体を含む一般的な用語である。

【0128】

脂質凝集体形成化合物 (Lipid Aggregate-forming Compounds) とは、天然の化合物または脂質 (例えば、DOPE、DOPC およびコレステロールなど) を言う。

【0129】

標的細胞とは、所望の化合物に対するキャリアとしての脂質凝集体を使用して、所望の化合物が送達される任意の細胞を言う。

【0130】

本明細書中で使用されるトランスフェクションは、核酸、タンパク質、または他の巨大分子の標的細胞への送達を意味し、その結果、核酸、タンパク質または他の巨大分子がその細胞内で発現されるか、またはその中で生物学的機能を有することを意味する。用語「発現可能な核酸」は、分子量に関わらずにDNAおよびRNAの両方を含み、そして用語「発現」は、限定しないが、一時的な発現および安定な発現の両方を含む、その細胞内で核酸が機能的に存在する任意の出現を意味する。機能的な局面には、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質の送達による発現の阻害を含む。

【0131】

トランスフェクションエンハンサーは、一般に、例えば、細胞ターゲッティング、取り込み、インターナリゼーション、核ターゲッティングおよび発現を高めるタンパク質、ペプチド、成長因子などの分子および物質を言う。このような分子および物質としては、細胞表面を標的とするインスリン、トランスフェリン、フィブロネクチンなどのリガンド；細胞性インテグリンレセプターを標的とするペプチド；および他の化合物 (例えば、Plus Reagent (Life Technologies, Inc.、Rockville、Marylandから入手可能) が挙げられる。トランスフェクションエンハンサーの例は、米国特許第5,736,392号および米国出願番号09/039,780 (

10

20

30

40

50

1998年3月16日出願)に見出され得る。

【0132】

本発明は、さらに、以下の実施例によって明らかにされる。以下の実施例は、本発明の単なる例示であることが意図される。ポリカチオン性脂質を以下に記載される一般的な反応スキームに従って調製した。

【0133】

(実施例1)

(N¹, N⁴-ジオレオイル-ジアミノブタン (I) の合成)

1, 4-ジアミノブタン (4.28 g、48.6 mmol) およびトリエチルアミン (20.4 ml、146 mmol) の乾燥メチレンクロリド (10 mL) 溶液を、オレオイルクロリド (30.0 g、99.7 mmol) の無水メチレンクロリド (300 mL) 溶液に、0℃の氷浴中でゆっくりと添加した。反応混合物をメカニカルスターラーで激しく攪拌した。添加が完了した後、氷浴を除去し、そして混合物を室温で2.5日間攪拌した。TLC分析によって、反応が完全に進行し、そして生成物が沈殿したことを確認した。過剰のオレオイルクロリドをろ過によって除去した。沈殿を50 mLのメチレンクロリドで2回洗浄した。母液を濃縮し、そして更なる生成物を沈殿させた。この沈殿物をろ過し、そして以前の沈殿と合わせた。この得られた固体を4時間、減圧乾燥した。全体で27.0 gの所望の生成物の白色固体、N¹, N⁴-ジオレオイル-ジアミノブタンを得た。

【0134】

(N¹, N⁴-ジオレイル-ジアミノブタン (II) の合成)

リチウムアルミニウムヒドリド (8.62 g、95%、216 mmol) を、0℃で400 mLの無水ジエチルエーテル中のN¹, N⁴-ジオレオイル-ジアミノブタン (27.0 g、43.8 mmol) の懸濁液に注意深く添加した。添加後、氷浴を除去した。反応混合物をゆっくりと室温まで昇温し、次いで、適切な凝縮デバイスを用いて緩やかに加熱して還流し、そして16時間攪拌した。反応混合物を次いで冷却し、そして70 mLの1Nの水酸化ナトリウム溶液で0℃で注意深くクエンチした。さらに500 mLのジエチルエーテルを添加し、そして混合物を室温でさらに2時間攪拌した。上部のエーテル層は徐々に透明に変わり、次いで分離した。この水相をそれぞれ100 mLのジエチルエーテルで3回抽出した。この合わせたエーテル溶液を濃縮し、そして高真空下で一晩乾燥した。全体で17.0 gの油状無色N¹, N⁴-ジオレイル-ジアミノブタンを得た。

【0135】

(N¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジ- [2-ヒドロキシ-3- (N-フタルアミド) プロピル] -ジアミノブタン (III) の合成)

ジイソプロピルエチルアミン (11.1 mL、63.7 mmol) を、N¹, N⁴-ジオレイル-ジアミノブタン (15.5 g、26.3 mmol) およびN- (2, 3-エポキシプロピル) -フタルアミド (15.6 g、76.8 mmol) の110 mLの乾燥N, N-ジメチルホルムアミドの懸濁液に添加した。窒素でのパージ後、反応混合物を丸底フラスコでシールし、そして約90℃で24時間加熱した。N, N-ジメチルホルムアミドおよびジイソプロピルエチルアミンを除去し、そして黄色オイルを得た。この粗物質をエタノールから再結晶した。全量が18.6 gの白色固体、N¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジ- [2-ヒドロキシ-3- (N-フタルアミド) プロピル] -ジアミノブタンを得た。

【0136】

(N¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジ- [2-ヒドロキシ-3- (N-アミノプロピル)] -ジアミノブタン (IV) (以後、DHDOSと呼ぶ) の合成)

ヒドラジン (4.0 mL、80%水性、103 mmol) を、室温で250 mLの乾燥エタノール中のN¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジ- [2-ヒドロキシ-3- (N-フタルアミド) プロピル] -ジアミノブタン (17.0 g、17.1 mmol) の懸濁液に添加した。適切な凝縮デバイスを使用して、反応混合物を加熱還流した。この時点で、懸濁液は透明な溶液に変わった。油浴を85℃に設定した。45分後、白色固体がこの溶液から沈殿した。反応混合物を4時間、還流させて攪拌し、その後、-20℃に冷却した。白

色固体が底に沈降した。上部の透明なエタノール溶液をデカントした。残渣を冷エタノールで2回洗浄した。この合わせたエタノール溶液を濃縮し、そして減圧下で一晩乾燥した。12.4 gの油状N¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタンを得た。

【0137】

以下の化合物を、対応するジアミンおよび長鎖アシクロリドを使用して上記の方法によって合成した：

N¹, N⁴-ジミリスチル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン；

N¹, N⁴-ジパルミチル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン； 10

N¹, N⁴-ジパルミトリル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン；

N¹, N⁴-ジステアリル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン；

N¹, N⁴-ジラウリル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン；

N¹, N²-ジミリスチル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン；

N¹, N²-ジパルミチル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン； 20

N¹, N²-ジパルミトリル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン；

N¹, N²-ジステアリル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン；

N¹, N²-ジラウリル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン；

N¹, N²-ジオレイル-N¹, N²-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノエタン；

N¹, N⁹-ジミリスチル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine； 30

N¹, N⁹-ジパルミチル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine；

N¹, N⁹-ジパルミトリル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine；

N¹, N⁹-ジステアリル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine；

N¹, N⁹-ジラウリル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine；

N¹, N⁹-ジオレイル-N¹, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-Jeffamine。 40

【0138】

(N¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-カルボキサミジン)アミノプロピル]-ジアミノブタン (V) の合成)

1H-ピラゾール-1-カルボキサミジンヒドロクロリド (45 mg、0.31 mmol) を、1 mLの乾燥N, N-ジメチルホルムアミド中のN¹, N⁴-ジオレイル-N¹, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)]-ジアミノブタン (115 mg、0.156 mmol) の溶液に添加した。この塩はジメチルホルムアミド (DMF) にあまり溶解しなかった。しかし、この混合物は、ジイソプロピルエチルアミン (55 μl、0.31 mmol) を添加した後、透明に変わった。この混合物を、窒素下、室温で 50

18時間撹拌した。溶媒を除去した後、粗物質をC-18逆相フラッシュカラムに充填し、そしてMeOH中20%のH₂O~MeOH中10%のH₂Oで溶離した。純粋な画分を収集し、そして濃縮した。81mgの無色で油状のN^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-カルボキサミジン) アミノプロピル] -ジアミノブタンが得られ、これをそのTFAおよびHCL塩に変換した。

【0139】

(N^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー {2-ヒドロキシ-3-[N-(N^I, N^{II}, N^{III}, N^{IV}-ブトキシカルボニルスペルミンカルボキサミド)] アミノプロピル} ジアミノブタン (VI) の合成)

混合溶媒 (100mLのDMFおよび100mLのCH₂Cl₂) 中の、Boc-スペルミン酸 (21.7g, 33.5mmol) およびN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) (3.91g, 34.0mmol) の溶液に、ジイソプロピルカルボジイミド (5.32mL, 34.0mmol) を室温で滴下した。2.5時間撹拌した後、塩化メチレンおよびDMF (40mL) 中のN^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-アミノプロピル)] ジアミノブタン (10g, 13.6mmol) の溶液を添加した。この混合物をさらに5時間撹拌し、その後、2.5%炭酸水素ナトリウム溶液 (200mL) でクエンチした。さらに300mLの塩化メチレンを添加した。水溶液を、120mLの塩化メチレンで3回抽出した。合わせた有機溶液を水で2回洗浄し、そして無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮した後、淡黄色の油状物を得た。粗物質を、シリカゲルを用いてCH₂Cl₂中2%MeOH~CH₂Cl₂中5%MeOHで溶離して、精製した。全部で13.1gの白色固体のN^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー {2-ヒドロキシ-3-[N-(N^I, N^{II}, N^{III}, N^{IV}-ブトキシカルボニルスペルミンカルボキサミド)] アミノプロピル} ジアミノブタンを得た。

【0140】

(N^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン (VII) の合成)

1, 4-ジオキサン (100mL) 中のN^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー {2-ヒドロキシ-3-[N-(N^I, N^{II}, N^{III}, N^{IV}-ブトキシカルボニルスペルミンカルボキサミド)] アミノプロピル} ジアミノブタン (11.8g, 5.92mmol) の溶液に、1, 4-ジオキサン中4.0Mの塩酸溶液 (100mL) を、室温で添加した。この酸の添加10分後、この反応混合物は濁った。室温で2.5時間撹拌した後、過剰の酸および溶媒を除去した。残渣を少なくとも5時間真空中で乾燥し、その後、C-18逆相フラッシュカラムに充填した。このカラムを、初めはMeOH中25%H₂O、次いで20%、そして次いで、17%で溶離した。純粋な画分を回収し、そして濃縮した。3.06gの無色固体のN^I, N⁴-ジオレイル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタンを得た。

【0141】

以下の化合物を、必要なジアミンおよび長鎖アシルクロリドで出発する、上記のプロトコルを使用して合成した：

N^I, N⁴-ジミリスチル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン；

N^I, N⁴-ジパルミチル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン；

N^I, N⁴-ジパルミトリル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン；

N^I, N⁴-ジステアリル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン；

N^I, N⁴-ジラウリル-N^I, N⁴-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカルボキサミド) -アミノプロピル] -ジアミノブタン；

N^I, N⁹-ジミリスチル-N^I, N⁹-ジー [2-ヒドロキシ-3-(N-スペルミンカ

ルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N⁹-ジパルミチル-N¹, N⁹-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N⁹-ジパルミトリル-N¹, N⁹-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N⁹-ジステアリル-N¹, N⁹-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N⁹-ジラウリル-N¹, N⁹-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N⁹-ジオレイル-N¹, N⁹-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - Jeffamine ;

N¹, N²-ジミリスチル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン ;

N¹, N²-ジパルミチル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン ;

N¹, N²-ジパルミトリル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン ;

N¹, N²-ジステアリル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン ;

N¹, N²-ジラウリル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン ;

N¹, N²-ジオレイル-N¹, N²-ジ- [2-ヒドロキシ-3-(N-スベルミンカルボキサミド) - アミノプロピル] - ジアミノエタン。

【0142】

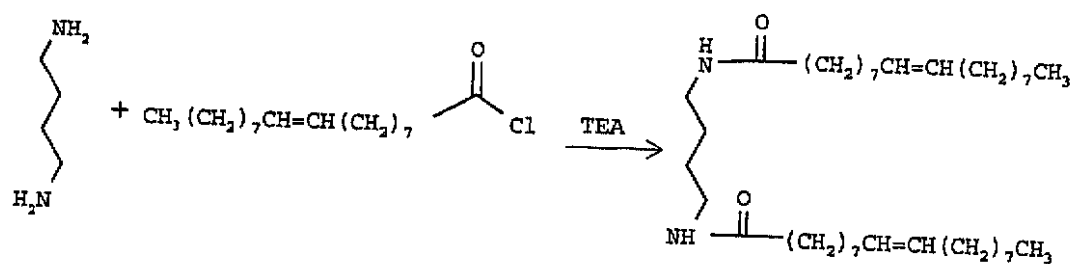
(ジヒドロキシ-ジオレイオール (dioleyol) - ジスベルミンカルボキサミドスベルミンおよびアナログの合成 (スキーム1))

【0143】

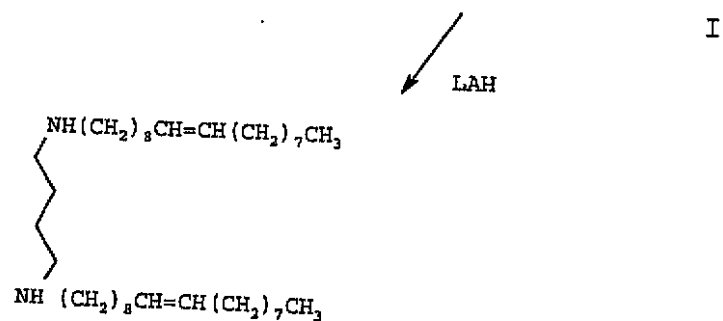
【化107】

10

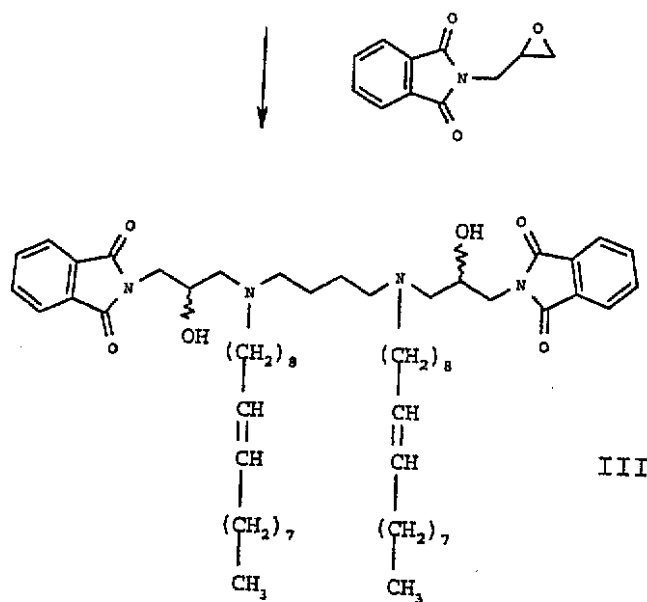
20



10

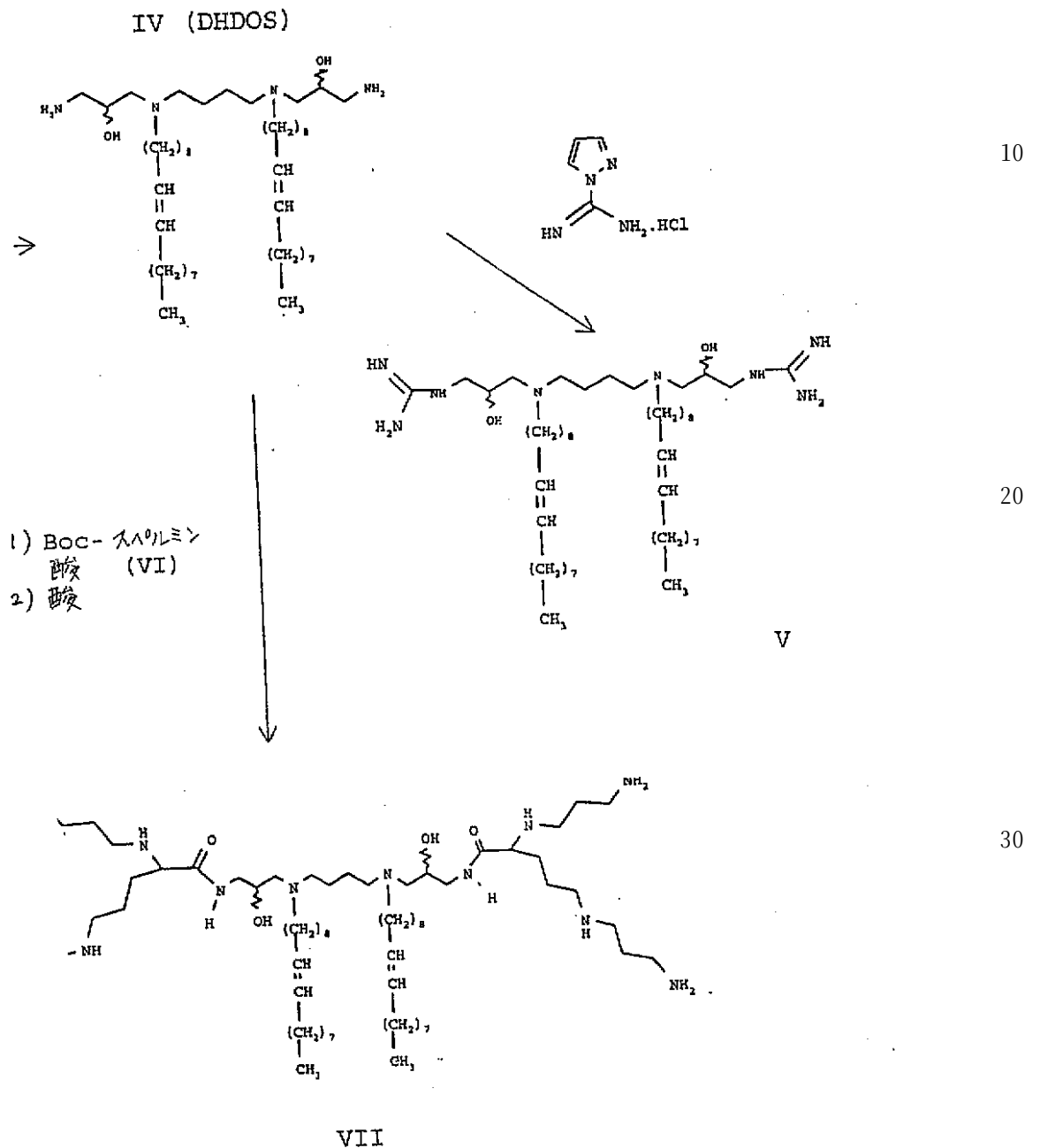


20



30

[15/07] のつぎ



(実施例 2)

(N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-3-シアノプロピルジアミノブタン (VIII) の合成)

エタノール (20 mL) 中の N^1 , N^4 -ジオレイル-ジアミノブタン (1.8 g、3.06 mmol) の溶液に、アクリロニトリル (0.43 mL、6.53 mmol) を室温で滴下した。この混合物を 30 分間攪拌した。全ての出発物質が生成物に変換したことを、TLC 分析によって確認した。粗物質をシリカゲルのフラッシュクロマトグラフィー (CH_2Cl_2 中 1% MeOH) を使用して精製した。透明なオイルを高収率で得た。

【0144】

(N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-3-(アミノプロピル)-ジアミノブタン (IX) の合成)

無水ジエチルエーテル（15 mL）中の N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-3-シアノプロピル-ジアミノブタン（2.12 g、3.05 mmol）の溶液に、LAH（9.2 mL、エーテル中1 M、9.2 mmol）の溶液を、0℃でゆっくりと添加した。添加後、この混合物を室温で20時間攪拌した。全ての出発物質が消費された。この反応混合物を、0℃で、1 N NaOH溶液でクエンチした。室温で2時間攪拌した後、この混合物をジエチルエーテルで3回抽出した。合わせたエーテル溶液を濃縮し、そして真空下で3時間乾燥した。油状の N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-3-（アミノプロピル）ジアミノブタンを高収率で得た。

【0145】

（ N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-〔3-（N-スベルミンカルボキサミド）-アミノプロピル〕-ジアミノブタン（XI）の合成）

10

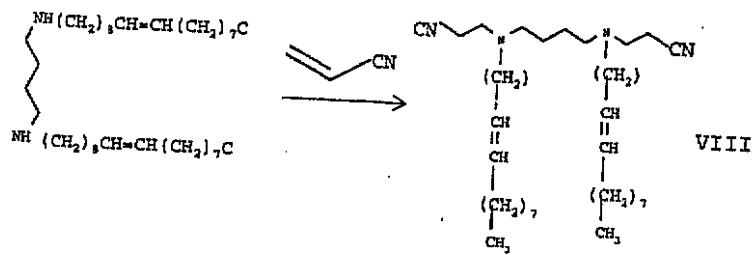
上記の N^1 , N^4 -ジオレイル- N^1 , N^4 -ジ-〔2-ヒドロキシ-3-（N-スベルミンカルボキサミド）-アミノプロピル〕-ジアミノブタンを作製するための手順を行った。

【0146】

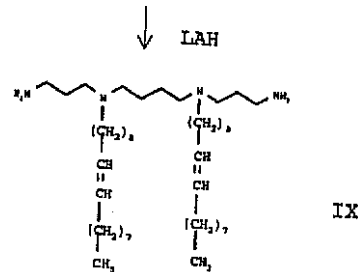
（ジオレイオール-ジスベルミンカルボキサミドスベルミンおよびアナログの合成（スキーム2））

【0147】

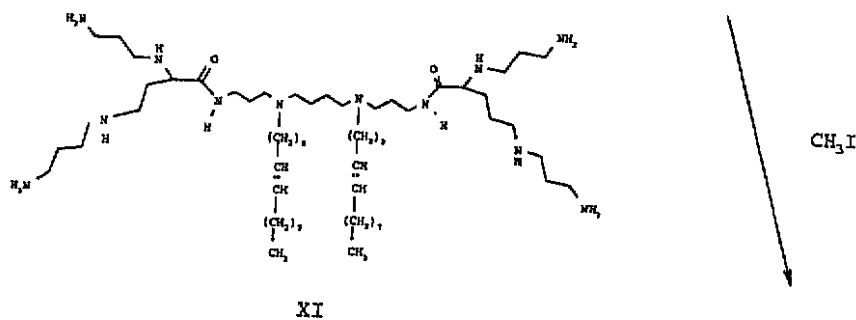
【化108】



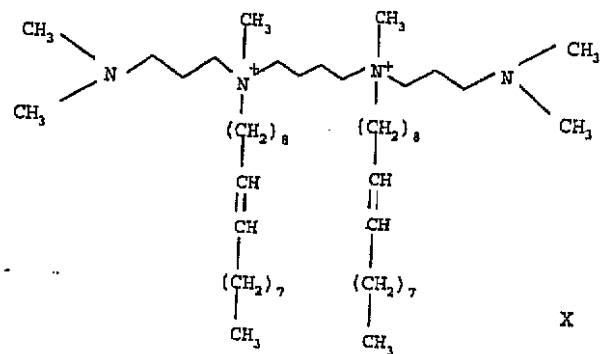
10



1) ステロルミン酸 (VI)
2) 縮合



20



30

(実施例 3)

(コレステロールアナログの合成)

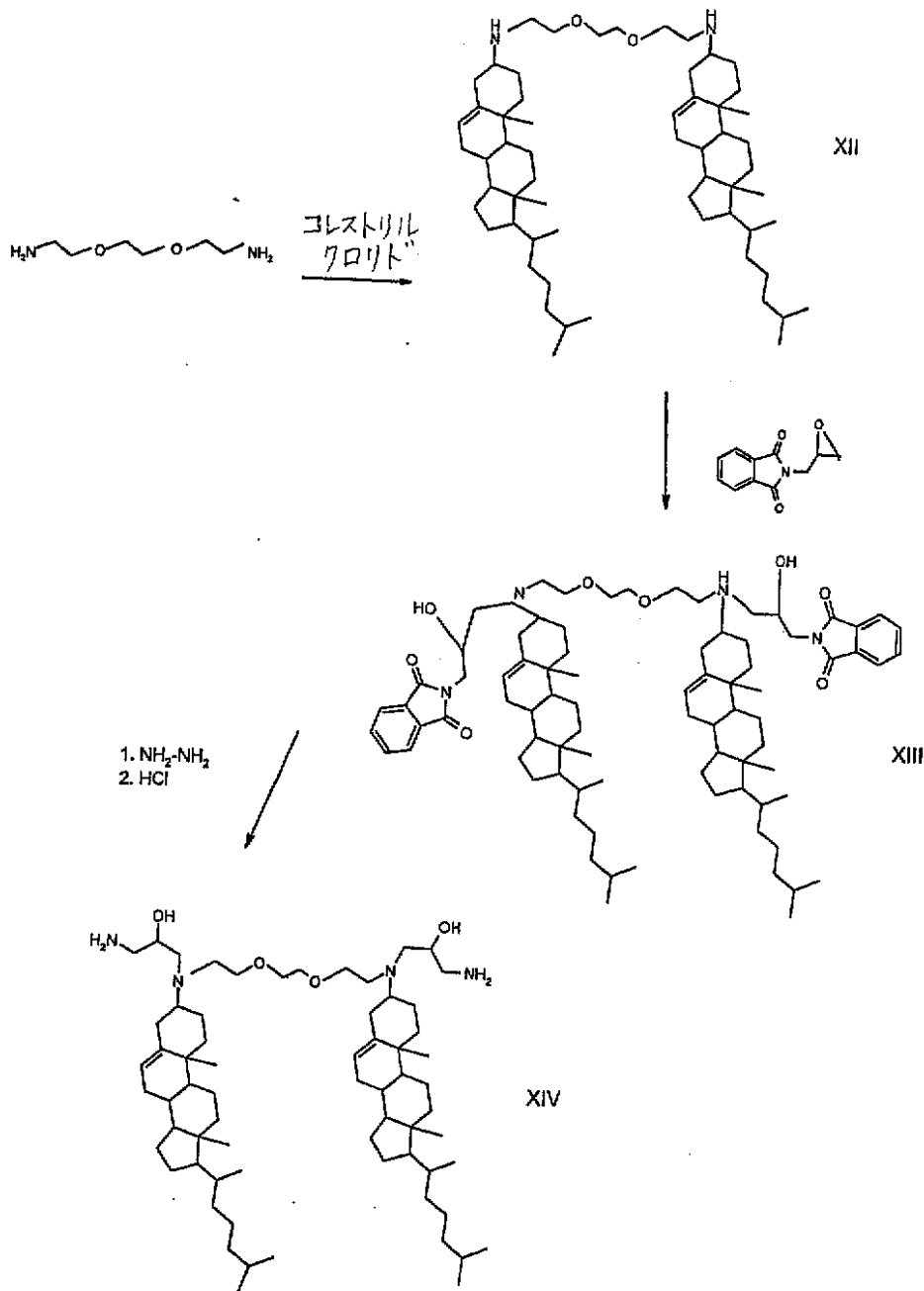
以下に示されたスキームを使用することによって、コレステロールアナログを合成し得る (スキーム 3)。ジェファミン (jefamine) をコレストリル (cholestryl) クロリドを用いてアルキル化し、ジコレストリルジェファミンアナログ (XII) を得る。エポキシドフタルアミド (XIII) を用いてさらにアルキル化し、そしてヒドラジンを用いて脱保護して、本発明の化合物 (XIV) を得る。

【0148】

【化109】

40

コレステロールアナログの合成 (スキーム 3)



(実施例 4)

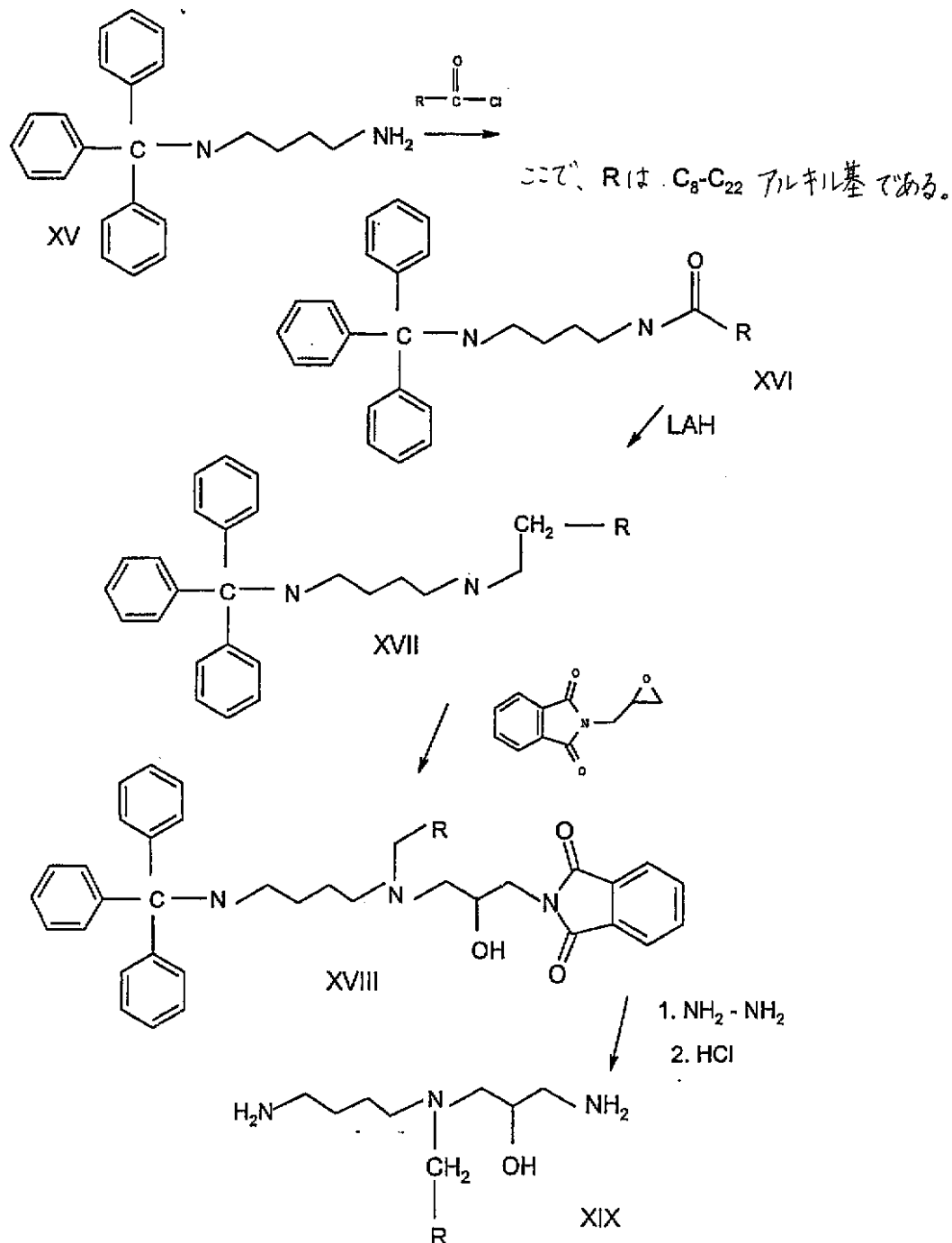
(モノアルキルアナログの合成)

モノアルキルアナログが所望される場合、上記スキーム 1 は、出発物質中のアミンのうちの 1 つが、アシル化工程の前に保護されるように、改変され得る。従って、トリチル保護ジアミノブタン (XV) は、アルカノイルクロリド (例えば、オレオイルクロリド) を用いてアシル化され、続いて、L A H 還元され、化合物 X V I I I が得られる。次いで、このアミンは、所望のフタルアミドエポキシドを用いてアルキル化されて、化合物 X V I I I が得られる。ヒドラジンを使用してフタルアミドを除去することによって、所望のアミン X I X が得られる (スキーム 4 を参照のこと)。

【0149】

【化110】

モノアルキルアナログの合成 (スキ-44)



(実施例 5)

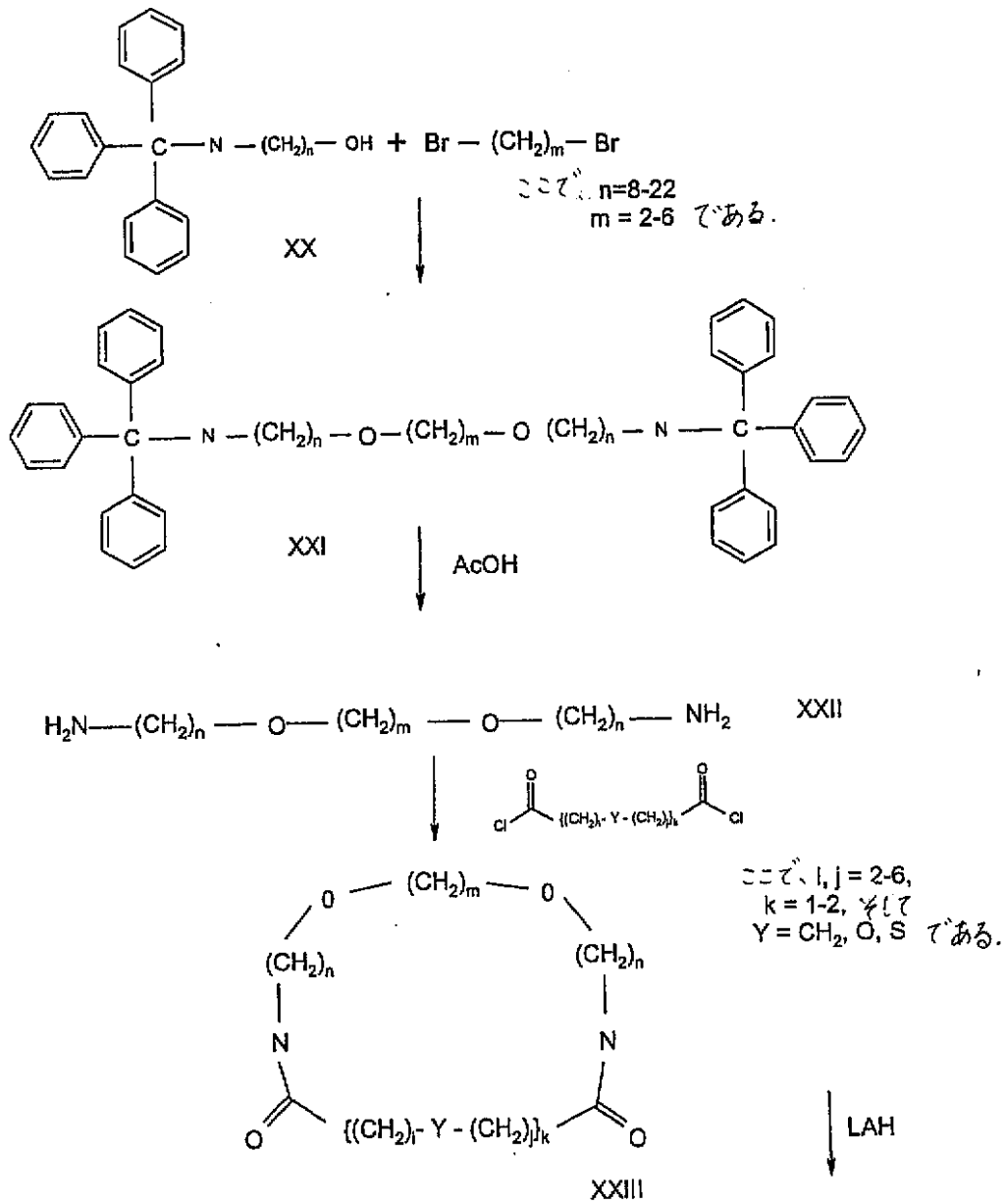
(環状アナログの合成)

以下のスキーム (スキ-5) は環状アナログを作製するために使用し得る。所望の鎖を有するトリチル保護アミノアルコール (XX) を、ジブromoアルキル (例えば、ジブromobutan) を使用してアルキル化する。トリチルを所望のダイマー (XXI) から除去し、そしてジアシルクロリド (例えば、スクシニルクロリド) を使用してアシル化する。次いで、アミド (XXIII) を LAH を用いて還元し、そして所望のフタルアミドエポキシドを使用してアルキル化する。フタルアミドの除去によって、本発明の所望の化合物を得る。

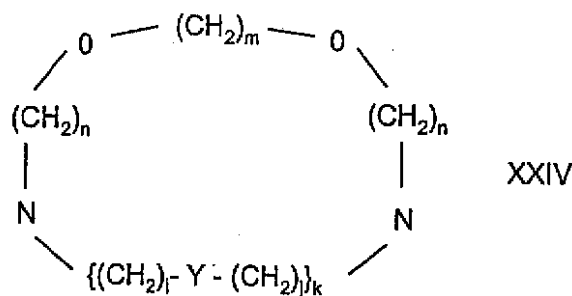
【0150】

【化 1 1 1】

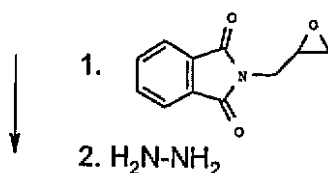
環状アザロウの合成 (スキ-45):



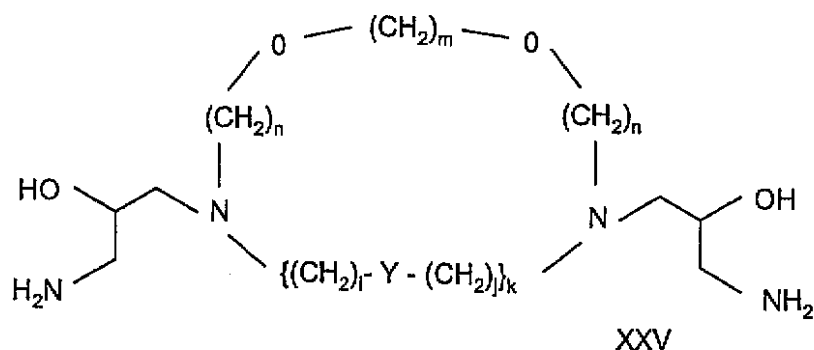
[化111] のつづき



10



20



30

(実施例6)

(ポリマーアナログの合成)

本発明のポリマーアナログは、ポリマーアミン（例えば、出発物質としてのPEI、またはデントリマーポリアミン）を使用することによって合成し得る。例えば、PEIは、アルキロイルクロリド（例えば、オレオイルクロリド）でアシル化され得、次いでこのアシル化されたPEIは、水素化リチウムアルミニウムで還元され得、本発明の化合物を与える。

【0151】

上記の方法は、特定の化合物の合成を例示するが、反応スキームは、本発明に従う様々な化合物を調製するための一般的な方法を提供する。当業者は、本明細書中で詳述されたものの以外の代替の方法および試薬が、本発明の化合物を生成するように使用されるか、または容易に適合されることを理解する。

40

【0152】

本発明の化合物は、従来技術の化合物（例えば、DOTMA、DOTAP、DOGS、DOSPAなど）と同様の様式で使用され得る。このようなカチオン性脂質を脂質凝集体に組み込むための方法は、当該分野で周知である。代表的な方法は、以下により開示される：Felgnerら、前出；Eppsteinら、前出；Behrら、前出；Bangham, A. ら（1965）M. Mol. Biol. 23:238~252；Olson, F. ら（1979）Biochim. Biophys. Acta 557:9~23；S

50

zoka, F. ら (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194~4198; Mayhew, E. ら (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775: 169~175; Kim, S. ら (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 728: 339~348; および Fukunaga, M. ら (1984) *Endocrinol.* 115: 757~761。送達ビヒクルとして使用するのに適切なサイズの脂質凝集体を調製するための技術には、超音波処理、ならびに凍結融解および押出し（おそらく最も一般的に使用される）が挙げられる。例えば、Mayer, L. ら (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858: 161~168を参照のこと。ミクロ流動化は、一貫して小さく（50~200 nm）そして比較的均一な凝集体が所望される場合に使用される（Mayhew, E. 前出）。直径約50 nm~約200 nmの範囲の凝集対が好ましい。しかし、それより大きいサイズの凝集体および小さいサイズの凝集体の両方が機能的である。

10

【0153】

他の化合物をトランスフェクションおよび送達する方法は、当該分野で周知である。本発明の化合物および組成物は、他の公知のトランスフェクション試薬にののために使用される同一のプロセスにおいて使用され得る脂質凝集体を生成する。

【0154】

多くの一般的なパラメーターがトランスフェクションまたは送達の最適な効率に重要であることが当業者に容易に明らかである。これらのパラメーターには、例えば、カチオン性脂質の濃度、送達される化合物の濃度、トランスフェクトされる細胞の数、送達のために用いられる媒体、細胞がポリアニオン脂質複合体でインキュベートされる時間の長さ、およびカチオン性脂質および非カチオン性脂質の相対量が挙げられる。これらのパラメーターを各々の特定の細胞型について最適化する必要があり得る。このような最適化は、本明細書中で提供されるガイダンスおよび当該分野で一般的に利用可能な知識を慣用的に使用する。

20

【0155】

本明細書中で詳述されるもの以外の代替の方法、試薬、手順および技術が、本発明のリボソーム前駆体およびトランスフェクション組成物を生成するために、使用され得るか、または容易に適合され得ることもまた、当業者に明らかである。このような代替の方法、試薬、手順および技術は本発明の精神および範囲内である。

30

【0156】

本発明の代表的な化合物の使用は、以下の実施例を参照することによってより詳述される。本明細書中で使用される全ての略語は、当該分野で標準的な略語である。詳述されない特定の手順は参照されるか、または当該分野で周知であるかのいずれかである。

【0157】

（実施例7）

この実施例は、市販のカチオン性脂質トランスフェクション試薬および本発明の化合物を使用して、HEK-293（ヒト胚性腎臓由来の細胞株）、COS-7（SV40形質転換サル細胞株）、CHO-K1（チャイニーズハムスター卵巢由来の細胞株）およびHeLa（ヒト頸部癌由来の細胞株）の細胞のトランスフェクションを、 β -ガラクトシダーゼレポータープラスミドDNA pCMV・SPORT- β -gal（Life Technologies, Rockville, MD）と比較する。

40

【0158】

これらの細胞を、トランスフェクションの前日に、24ウェル組織培養プレートに、0.4 ml DMEM培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Life Technologies, Rockville, MD）（これは、1%可欠アミノ酸（NEAA）溶液（Life Technologies）および10% FBSを含有する）の総容量でプレートした。HEK-293およびCOS-7細胞について、組織培養プレートは、細胞付着を増加するために、ポリ-L-リジンで予めコーティングした。

50

【0159】

次の日、DNAトランスフェクション試薬複合体を以下のように調製した：

カチオン性脂質試薬およびDNAを、1%のNEAAを含有する血清を含まないDMEMの25 μ lアリコートに別々に希釈した。LipofectAMINE PLUSについて、7~14 μ lのPLUS試薬をこのDNAに添加し、混合し、そして室温で15分間インキュベートした。この希釈したDNAを、希釈した脂質と合わせ、そして室温で15分間インキュベートし、DNAおよび脂質に複合体を形成させた。このインキュベーションに続いて、この複合体を培地に直接滴下し、そして培養プレートに前後に振動させることによって混合した。この細胞をさらに、37℃で、全部で24時間インキュベートし、レポータープラスミドである、pCMV $\cdot$ SPORT β -galによりコードされるlacZ導入遺伝子を発現させた。トランスフェクション後24時間で、増殖培地およびトランスフェクション複合体をウェルから除去し、そして各ウェル中の細胞を1mlのDPBS (Dulbecco's PMS, Life Technologies, Rockville, MD) で手短かにリンスした。各ウェル中の細胞を、0.15~2.0mlの0.1%Tris (pH8.0、0.1M Triton X-100を含有する) を添加することによって溶解した。このプレートを、-80℃で最低2時間冷凍し、そして室温または37℃で解凍した。この解凍した細胞溶解物を、遠心分離により清浄化し、上清を、酵素基質ONPGを使用して、 β -gal活性についてアッセイした。細胞溶解物中の全タンパク質の濃度もまた、Bradfordアッセイ (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) を使用して決定した。トランスフェクトされた細胞抽出物における β -gal活性を、標準曲線に対して計算し、そしてトランスフェクション毎の全活性を示すために組織培養プレートの表面積あたりのng β -gal (ng/cm²) として表すか、または特異的活性を示すために、全タンパク質1 μ gあたりのng β -gal (ng/ μ g) として表した。

【0160】

HEK-293 (図1)、COS-7 (図2)、CHO-K1 (図3)、およびHeLa (図4) の細胞を、0.4または0.8 μ gのpCMV $\cdot$ SPORT β -gal DNA および0.2~4.0 μ lのトランスフェクション試薬でトランスフェクトした。試験されたトランスフェクション試薬は、中性のc α -脂質であるコレステロールと共に、2mg/mlで処方されたDHDOS (IV) (1:15 (M/M) のDHDOS対コレステロールの比) ; 中性のc α -脂質であるDOPE (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン) と共に2mg/mlで処方されたDHDOS (1:1 (M/M) のDHDOS対DOPEの比) ; LipofectAMINE PLUS (LIFE Technologies, Rockville MD) ; およびFuGENETM-6 (Boehringer Mannheim, Germany) であった。DHDOS処方物を、0.2~1.5 μ lの範囲で試験した; LipofectAMINE PLUS およびFuGENE-6を0.2~4.0 μ lの範囲で試験した。FuGENE-6をメーカーの奨励するプロトコルに従って使用した。DHDOSおよびLipofectAMINE PRUSを、上記のプロトコルに従って使用した。図に示されるデータは、トランスフェクトDNAによる全ての発現をより良く比較するために、総活性 (ng/cm²) として表される。0.4および0.8 μ gのDNAを用いた場合に得られる結果と同様であるため、0.8 μ gのDNAを用いた場合の結果のみを示す。

【0161】

(実施例8)

一次、継代、正常ヒト線維芽細胞 (NHF) を、1ウェルにつき1.6 $\times$ 10⁴個の細胞の密度で96ウェルプレートにプレートし、そして次の日にトランスフェクトした。各ウェル中の細胞を、40ngのpCMV $\cdot$ SPORT β -gal DNA および0.1または0.2 μ lの脂質でトランスフェクトした。このDNAおよび脂質を10 μ lのDME Mに別々に希釈した。このDNAを単独で使用するか、または、脂質と複合体化する前に、PLUS、インスリン、トランスフェリンまたはインテグリンターゲッティングペプチ

ドと予備混合した。複合体化して15分後、DNA-脂質を細胞に添加した。細胞を、上記のように、 β -gal活性についてアッセイした。

【0162】

【表1】

活性 (ng/ β gal/cm ²)					
脂質	DNA	DNA および PLUS*	DNA および インスリン	DNA および トランスフェリン	DNA および インテグリン ターゲティング ペプチド **
LipofectAMINE	10.36	28.6	ND	17.4	ND
式Xの 化合物 1:1.5 DOPE 1 mg/ml	ND	37.8	ND	ND	40.9
式VIIの 化合物 1:1 DOPE 2 mg/ml	29.4	637.9	195.7	21.7	587.9

ND = 検出不可能な活性

* PLUS 試薬は Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland. から入手可能である。

** 参考文献 : S.L. HART, (1998), Human Gene Therapy, 9:575-585.

これらの結果は、これらのカチオン性脂質処方物がDNA分子のみを送達し得るが、脂質が、DNAと結合する、ペプチドまたはタンパク質と共に使用される、および／または細胞表面レセプターに対するリガンドとしてはたらくか、あるいはそうでなければ細胞および／または核の取り込みを増加する場合、送達および最終的に遺伝子発現が高められ得ることを示す。

【0163】

理解を明確にする目的のために、図示および実施例によって幾分か詳細に本発明をここで十分に記載してきたが、条件、処方物および他のパラメーターの広範かつ等価な範囲内で、本発明を改変または変更することによって、発明の範囲またはその任意の特定の実施形態に影響することなく、同様なものが実施され得、そしてこのような改変および変更は、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されることが当業者に明らかである。

【0164】

本明細書中に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明に係る当業者のレベルを示し、そして各個々の刊行物、特許または特許出願が参考として詳細かつ個別に援用されることが示される場合と同じ程度の参考として、本明細書中で援用される。

【図面の簡単な説明】

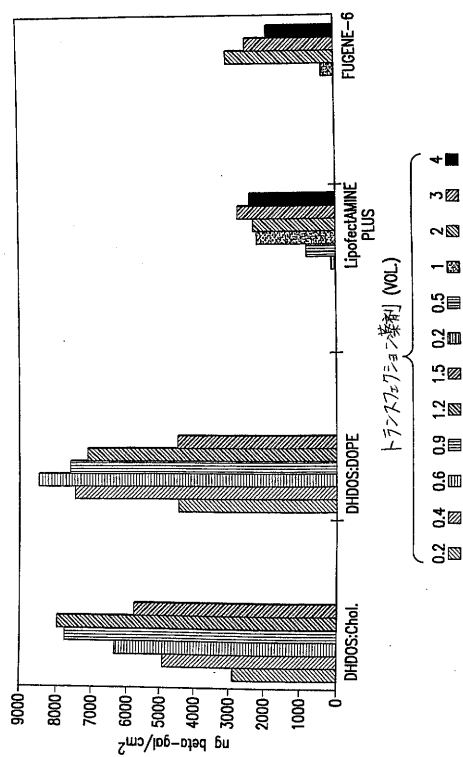
【図1】 図1は、カチオン性トランスフェクション薬剤を用いたHEK-293細胞のトランスフェクションを示すグラフである。

【図2】 図2は、カチオン性トランスフェクション薬剤を用いたCOS-7細胞のトランスフェクションを示すグラフである。

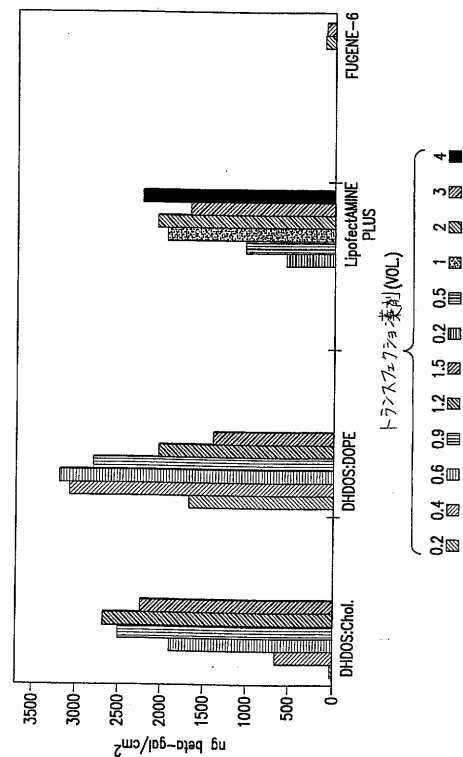
【図 3】 図 3 は、カチオン性トランスフェクション薬剤を用いた C H O - K 1 細胞のトランスフェクションを示すグラフである。

【図 4】 図 4 は、カチオン性トランスフェクション薬剤を用いた H e L a 細胞のトランスフェクションを示すグラフである。

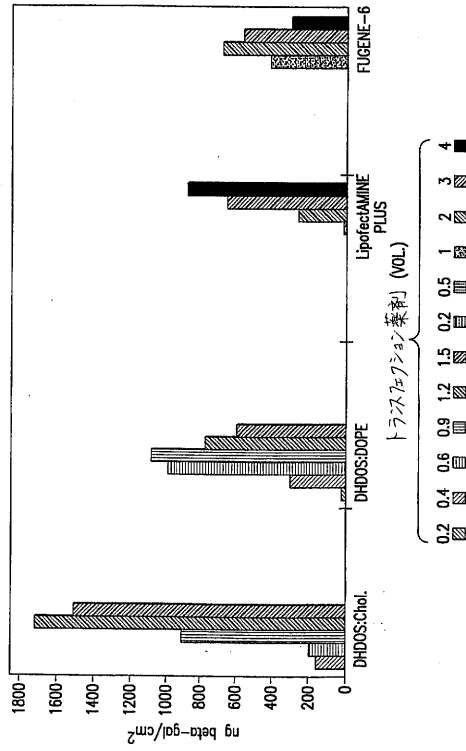
【図 1】



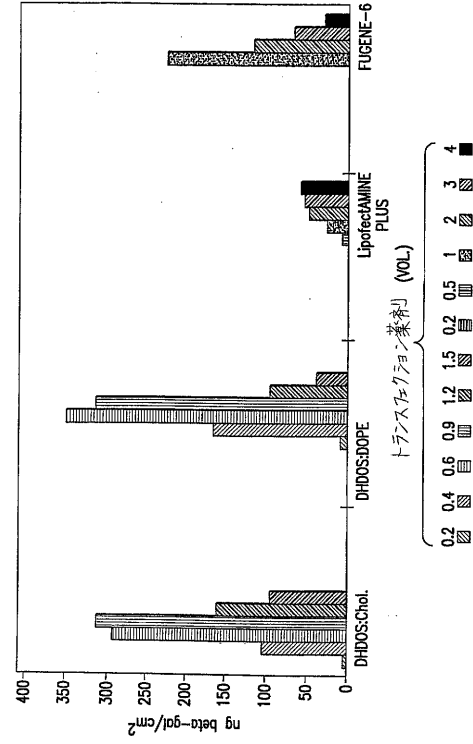
【図 2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 C 211/63	(2006.01)	C 0 7 C 211/63	
C 0 7 C 215/18	(2006.01)	C 0 7 C 215/18	
C 0 7 C 217/08	(2006.01)	C 0 7 C 217/08	
C 0 7 C 237/10	(2006.01)	C 0 7 C 237/10	
C 0 7 C 279/08	(2006.01)	C 0 7 C 279/08	
C 0 7 D 211/26	(2006.01)	C 0 7 D 211/26	
C 0 7 D 213/38	(2006.01)	C 0 7 D 213/38	
C 0 7 D 241/12	(2006.01)	C 0 7 D 241/12	
C 0 7 D 273/08	(2006.01)	C 0 7 D 273/08	
C 0 7 D 291/02	(2006.01)	C 0 7 D 291/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(72)発明者 チュ, ヨンリャン

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, スターリング テラス 10123

(72)発明者 マソウド, マレク

アメリカ合衆国 メリーランド 20879, ゲイザーズバーク, バデンロック ウェイ ナンバー301 7902

(72)発明者 ゲベユー, グリラ

アメリカ合衆国 メリーランド 20854, ポトマック, リバーズ エッジ ドライブ 12400

審査官 富永 保

(56)参考文献 国際公開第97/042819 (WO, A1)

特表平09-510435 (JP, A)

特表平10-506901 (JP, A)

特表平09-509402 (JP, A)

米国特許第05744335 (US, A)

特開平10-152461 (JP, A)

国際公開第96/026179 (WO, A1)

特表平08-509953 (JP, A)

国際公開第98/040502 (WO, A1)

国際公開第98/040499 (WO, A1)

特表平10-510813 (JP, A)

仏国特許出願公開第01567214 (FR, A1)

特表2001-525419 (JP, A)

Chemical Abstracts, 130, abs.no.91045

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

CA/REGISTRY(STN)